

**DIE KALIUM - PUMPE DER INSEKTEN:
VERSUCHE ZUR SOLUBILISIERUNG UND REINIGUNG
EINER VAKUOLEN - TYP - ATPase
AUS K⁺ - TRANSPORTIERENDEN MEMBRANEN
DES MITTELDARMEPITHELIS VON **MANDUCA SEXTA****

Inaugural — Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von Helmut Schweikl
aus Schweinhütt/Regen

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIE KALIUM-PUMPE DER INSEKTEN:
VERSUCHE ZUR SOLUBILISIERUNG UND REINIGUNG EINER
VAKUOLEN-TYP-ATPase AUS K^+ -TRANSPORTIERENDEN MEMBRANEN
DES MITTELDARMEPITHELS VON MANDUCA SEXTA

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der *Fakultät f. Biologie*
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Helmut Schweikl
aus Schweinhütt/Regen

1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Wieczorek
2. Berichterstatter: PD Dr. W. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.1988

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Professor Dr. Helmut Wieczorek in der Zeit von September 1984 bis April 1986 am Zoologischen Institut der Universität Regensburg, von Mai 1986 bis April 1988 am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. Helmut Wieczorek für die Stellung des Themas, sowie sein stetiges kritisches Interesse am praktischen und theoretischen Fortgang der Arbeit.
- Frau Dr. Ulla Klein für die Anleitung bei den elektrophoretischen Arbeiten.
- Frau Margit Schindlbeck (München) und Frau Bärbel Kellerer (Regensburg) für die große Hilfe bei der Durchführung biochemischer Tests.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	6
Verzeichnis der Abbildungen	7
Verzeichnis der Tabellen	8
 1. EINLEITUNG	 9
1.1 ATP-abhängige Ionenpumpen	9
1.2 Die Kalium-Pumpe in Insektenepithelien	10
1.3 Die Kalium-Pumpe der Schmetterlingsraupen	12
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	13
 2. MATERIAL und METHODEN	 15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Versuchstiere	15
2.3 Membranpräparationen	15
2.3.1 Präparation einer mit GCAM angereicherten Membranfraktion aus dem Mitteldarmepithel von <i>Manduca sexta</i>	15
2.3.2 Rohextrakt des Mitteldarmepithels von <i>Manduca sexta</i>	17
2.4 Solubilisierung	17
2.4.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln	17
2.4.2 Solubilisierung mit nicht-ionischen Detergentien	18
2.5 Dichtegradienten-Zentrifugationen	18
2.6 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	19
2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)	19
2.7.1 SDS-PAGE	19
2.7.2 Native PAGE	20
2.7.3 Mikrogradientengele (μ PAGE)	21
2.8 ATPase-Tests	21
2.8.1 Membrangebundene ATPase	21
2.8.2 Solubilisierte ATPase	22

	Seite
2.9 Phosphat-Nachweis	23
2.10 Proteinbestimmung	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1 Eigenschaften der membrangebundenen GCAM-ATPase	25
3.1.1 Charakterisierung der mit GCAM angereicherten Membranfraktion	25
3.1.2 KCl-Abhängigkeit	28
3.1.3 Substrat-Spezifität	29
3.1.4 Inhibitor-Sensitivität	30
3.1.5 Salz-Selektivität	33
3.1.6 ATP-Abhängigkeit	35
3.2 Solubilisierung der GCAM-ATPase	37
3.2.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln	37
3.2.2 Ausgangsmaterial der Solubilisierung mit Detergentien	38
3.2.3 Solubilisierung mit Polyoxyethylen-10-Laurylether	39
3.2.4 Exkurs: ATP-regenerierendes System	41
3.2.5 Azid- und Vanadat-sensitive ATPase-Aktivitäten	44
3.2.6 Mikrogelelektrophorese solubilisierter Proteine	45
3.3 Reinigung der GCAM-ATPase	47
3.3.1 Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten	47
3.3.2 Mikrogelelektrophorese der 30%-Saccharose-fraktion	50
3.3.3 FPLC mit Anionenaustauscher	51
3.3.4 Zusätzliche Dichtegradienten-Zentrifugation	55
3.3.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
3.3.6 Zusammenfassende Darstellung der Reinigung der GCAM-ATPase	57

	Seite
3.4	Eigenschaften der gereinigten GCAM-ATPase 60
3.4.1	KCl-Abhängigkeit 63
3.4.2	Substrat-Spezifität 64
3.4.3	Inhibitor-Sensitivität 65
3.4.4	Salz-Selektivität 66
3.4.5	ATP-Abhängigkeit 69
4.	DISKUSSION 71
4.1	Die mit GCAM angereicherte Membranfraktion 71
4.2	Solubilisierung der GCAM-ATPase 76
4.3	Die gereinigte GCAM-ATPase 79
4.4	Die GCAM-ATPase im Vergleich zu anderen Ionentransport-ATPasen 81
4.5	Die GCAM-ATPase - eine Vakuolen-Typ-ATPase in der Plasmamembran 86
5.	ZUSAMMENFASSUNG 88
6.	LITERATURVERZEICHNIS 90

Verzeichnis der Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
C ₁₂ E ₈	Polyoxyethylen-8-Laurylether
C ₁₂ E ₉	Polyoxyethylen-9-Laurylether
C ₁₂ E ₁₀	Polyoxyethylen-10-Laurylether
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylenether)- N,N'-tetraessigsäure
GCAM	goblet cell apical membrane (= die Apikal- membran eines Zelltyps aus dem Mitteldarmepithel der Raupen von <i>Manduca sexta</i>)
GCAM-ATPase	die in der GCAM enthaltene ATPase
g _{av}	mittlere relative Zentrifugalkraft
K	Kilo-Dalton
MOPS	3-(N-Morpholino)-2- hydroxypropansulfonsäure
M _r	relative molekulare Masse
Nbd-Cl	7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NEM	N-Ethylmaleimid
NPP	p-Nitrophenylphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
μPAGE	Mikro-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagens
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
P _i	anorganisches Phosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SET	0.26 M Saccharose, 5 mM Na-EDTA, 5 mM Tris-HCl (pH 8.1)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1: KCl-Abhängigkeit der GCAM-ATPase-Aktivität	28
Abb. 2: Die Wirkung von NEM auf die GCAM-ATPase-Aktivität	32
Abb. 3: ATP-Abhängigkeit der GCAM-ATPase-Aktivität	36
Abb. 4: GCAM-ATPase-Aktivität mit und ohne ATP-regenerierendes System	43
Abb. 5: Native μ PAGE solubilisierter Proteine	46
Abb. 6: Verteilung von solubilisierter Azid- und Vanadat-insensitiver ATPase-Aktivität und Proteinmenge nach der Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten	48
Abb. 7: Native μ PAGE der 30%-Saccharosefraktion aus der Dichtegradienten-Zentrifugation	50
Abb. 8: FPLC mit Mono Q Anionenaustauscher	52
Abb. 9: SDS-PAGE der 30%-Saccharosefraktion und der FPLC-Fraktion	53
Abb. 10: Native μ PAGE der GCAM-ATPase nach FPLC und zweiter Dichtegradienten-Zentrifugation	54
Abb. 11: Native PAGE der 30%-Saccharosefraktion und SDS-PAGE der beiden aus dem Gradientengel eluierten hochmolekularen Proteinbanden	56
Abb. 12: Aktivität der gereinigten GCAM-ATPase als Funktion der Zeit in Inkubationsansätzen ohne ATP-regenerierendes System	62
Abb. 13: KCl-Abhängigkeit der gereinigten GCAM-ATPase	63
Abb. 14: ATP-Abhängigkeit der gereinigten GCAM-ATPase	70
Abb. 15: Modell des aktiven Kaliumtransports über die apikale Gobletzellmembran	75



Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tab. 1: ATPase-Aktivitäten in Rohextrakt, GCAM angereicherter Membranfraktion und GCAM	26
Tab. 2: Spezifische ATPase-Aktivitäten in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion	26
Tab. 3: Substrat-Spezifität der GCAM-ATPase-Aktivität	29
Tab. 4: Inhibitor-Sensitivität der GCAM-ATPase-Aktivität	31
Tab. 5: Salz-Selektivität der GCAM-ATPase-Aktivität	34
Tab. 6: Extraktion der GCAM-ATPase-Aktivität mit Dichlormethan und Chloroform	37
Tab. 7: Spezifische ATPase-Aktivitäten in tiefgefrorenen, mit GCAM angereicherten Membranfraktionen	39
Tab. 8: Vergleich von membrangebundener, solubilisierter (Überstand) und unlöslicher (Pellet) GCAM-ATPase-Aktivität	40
Tab. 9: Azid- und Vanadat-sensitive ATPase-Aktivitäten in Überstand und Pellet	44
Tab. 10: Verteilung von ATPase-Aktivitäten im Saccharose-Dichtegradienten	49
Tab. 11: Zusammenfassung der Daten zur Reinigung der GCAM-ATPase	58
Tab. 12: Darstellung sämtlicher individueller Meßpunkte der Fraktionen zur Reinigung der GCAM-ATPase	59
Tab. 13: Substrat-Spezifität der gereinigten GCAM-ATPase	64
Tab. 14: Inhibitor-Sensitivität der gereinigten GCAM-ATPase	66
Tab. 15: Salz-Selektivität der membrangebundenen und der gereinigten GCAM-ATPase in Tris-reduzierten Testansätzen	68

1. EINLEITUNG

1.1 ATP-abhängige Ionenpumpen

Der primäre Transport von Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten über die semipermeable Barriere zellulärer Membranen erfolgt mit Hilfe membranintegraler Transportproteine unter Verbrauch metabolischer Energie. Ist die Verschiebung der Ionen unmittelbar an die Hydrolyse von ATP gekoppelt, bezeichnet man das Transportsystem als ATPase. In umgekehrter Richtung werden unter physiologischen Bedingungen Protonengradienten über ATPasen zur Synthese von ATP genutzt. In allen Organismenreichen sind bis heute drei verschiedene Typen von Iontentransport-ATPasen nachgewiesen: solche des F-, des P- und des V-Typs (Pedersen & Carafoli, 1987).

Als F-Typ bezeichnet man die F_0F_1 -ATPasen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Es sind dies H^+ -ATPasen, die den Energieinhalt eines transmembranen Protonengradienten an die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat binden. Dabei fließen Protonen über den wasserunlöslichen F_0 -Sektor, der die Membran durchspannt, zur sphärischen, wasserlöslichen F_1 -Einheit, an der die Reaktion erfolgt. Die F_0F_1 -ATPasen sind komplexe Strukturen mit relativen molekularen Massen von etwa 450 K. Während die F_1 -Einheiten in sämtlichen Organismen einheitlich aus fünf verschiedenen Untereinheiten bestehen, bilden in Bakterien drei, in den Mitochondrien und Chloroplasten höherer Eukaryonten wahrscheinlich bis zu acht verschiedene Untereinheiten den F_0 -Sektor (Penefsky, 1979; Fillingame, 1980; Strotmann & Bickel-Sandkötter, 1984). Wesentlich einfacher aufgebaut sind die ATPasen der Plasmamembran niederer und höherer Eukaryonten, die Ca^{2+} -ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums, sowie die K^+ -ATPase in Bakterien, die den P-Typ von ATPasen bilden. Sie bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette von 70 - 100 K, ihre Aktivität wird durch Vanadat gehemmt, und sie bilden in ihrem Reaktionszyklus ein phosphoryliertes Zwischenprodukt. Ihr

typischer Vertreter in tierischen Zellen ist die Ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase. In basolateralen Membranen lokalisiert, kontrolliert sie durch den vektoriellen, partiell elektrogenen Transport von 3 Natriumionen im Austausch gegen 2 Kaliumionen die intrazelluläre Ionenzusammensetzung. Als alleinige Ausnahme in der Reihe der P-Typ ATPasen besteht sie aus drei verschiedenen Untereinheiten, einem 100 K Polypeptid mit katalytischer Funktion, einem ca. 50 K Glykoprotein und einem amphiphilen Peptid (7-8 K) bisher unbekannter Funktionen (Robinson & Flashner, 1979; Collins & Leszyk, 1987). Als V-Typ von ATPasen werden die H^+ -ATPasen des vakuolären Systems mit Ausnahme der Mitochondrien, der Chloroplasten und des sarcoplasmatischen Reticulums beschrieben (Mellman et al., 1986). Über diese ATPasen der in exo- und endozytotische Prozesse involvierten Zellorganellen ist bis heute verglichen mit den F- und P-Typen von ATPasen wenig bekannt. Ihre molekulare Masse wird auf > 400 K geschätzt, sie bestehen aus mehreren Polypeptiden von 15 - 115 K. Sie sind elektrogene Protonenpumpen, bilden aufgrund ihrer Insensitivität gegen Vanadat wahrscheinlich kein phosphoryliertes Zwischenprodukt in ihrem Reaktionszyklus und sie sind insensitiv gegen Azid und Oligomycin, beides Hemmstoffe der mitochondrialen ATPase. Ein charakteristischer Hemmstoff der V-Typ-ATPasen ist das SH-Gruppen-Reagens N-Ethylmaleimid.

1.2 Die Kalium-Pumpe in Insektenepithelien

Verschiedene Insektenepithelien zeichnen sich durch den Besitz einer einzigartigen elektrogenen Alkali-Ionenpumpe aus. Da unter physiologischen Bedingungen Kalium das bevorzugt transportierte Ion ist, wird sie als Kalium-Pumpe bezeichnet. In Sinnesepithelien dient sie bei der sensorischen Transduktion als Energiequelle für den Rezeptorstrom, in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts der Sekretion von Salzen und Wasser (Speicheldrüsen, Malpighische Gefäße, Mitteldarm der Schmetterlingsraupen), im Mitteldarm der

Schmetterlingsraupen auch der Resorption von Aminosäuren (Hanozet et al, 1984; Sacchi et al., 1984). In allen Epithelien werden Kaliumionen aktiv von basal nach apikal über das Epithel gegen eine Potentialdifferenz von etwa 100 mV und gegen einen Kalium-Konzentrationsgradienten transportiert. Nach ersten Untersuchungen von Ramsay (1953), der einen aktiven Kaliumtransport gegen einen Konzentrationsgradienten messen konnte, vermutete Maddrell (1977) die Position der Kalium-Pumpe in Malpighischen Gefäßen aufgrund von Fluxmessungen, sowie dem Vorhandensein von Portasomen in der apikalen Membran der Epithelzellen. Gupta et al. (1978) konnten beweisen, daß die Kalium-Pumpe in den Epithelzellen der Speicheldrüsen der Dipteren ebenfalls in der apikalen Plasmamembran lokalisiert ist. Auch in den Sensillen des Fliegenlabellums befindet sich die elektrogene Kalium-Pumpe in den Apikalmembranen der Hüllzellen (Thurm & Küppers, 1980). Durch den aktiven Transport von Kalium aus dem Zytoplasma in den äußeren Sensillenlymphraum entsteht ein transepitheliales Potential. Die O₂-abhängige Kalium-Pumpe ist insensitive gegen Ouabain, den klassischen Hemmstoff der Na-Pumpe. Die zytoplasmatische Seite der Apikalmembran der Hüllzellen ist mit ca. 10 nm großen Partikeln, sog. Portasomen besetzt (Thurm, 1974; Wieczorek & Gnatzy, 1985), die man auch in der Apikalmembran der sensorischen Hilfszellen von *Bombyx mori* nachweisen konnte (Steinbrecht, 1986). Biochemische Untersuchungen mit Membranfraktionen aus dem Sinnesepithel des Fliegenlabellums zeigen die Existenz einer nicht-mitochondrialen Kalium-stimulierbaren ATPase-Aktivität (Wieczorek, 1982; Wieczorek & Gnatzy, 1985).

1.3 Die Kalium-Pumpe im Mitteldarmepithel der Schmetterlingsraupen

Das Mitteldarmepithel der Schmetterlingsraupen ist ein einschichtiges Epithel, das im wesentlichen aus zwei verschiedenen Zelltypen, säulenförmigen und becherförmigen Zellen, besteht (Cioffi, 1979). Die becherförmige Zelle bezeichne ich in Anlehnung an den englischen Terminus (goblet cell) im folgenden als Gobletzelle. Ein besonderes "Problem" erwächst den pflanzenfressenden Schmetterlingsraupen aus ihrer Ernährungsweise: die mit dem Pflanzenmaterial aufgenommene große Menge an Kalium gelangt in Folge seines Konzentrationsgradienten aus dem Darm in die Hämolymphe. Die dadurch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration stört die Zellhomöostase, Kalium muß deshalb aus der Hämolymphe entfernt werden. Die Kalium-Pumpe im Mitteldarmepithel, erstmals in den 60er-Jahren von Harvey und Nedergaard (1964) nachgewiesen, sorgt für die Ionenbalance.

Harvey und Nedergaard (1964) gelang es, einen Natrium-unabhängigen aktiven Kaliumtransport von der Hämolymphe-seite zur Lumenseite am isolierten Mitteldarmepithel von Hyalophora cecropia zu messen. Es wird dabei ein transepitheliales Potential von ca. 100 mV (Lumenseite positiv) aufgebaut, die Pumpe ist elektrogen (Harvey et al., 1968). Neben Kalium werden auch Rubidium, Natrium und Lithium aktiv transportiert, der Transport ist insensitiv gegen Ouabain (Harvey & Zerahn, 1971). Da der Kalium-Transport nicht nur in Abwesenheit von Sauerstoff erliegt (Harvey et al., 1967), sondern auch an die Anwesenheit von ATP als Energiequelle gebunden ist (Mandel et al., 1980), durfte man annehmen, daß die Grundlage des transepithelialen Kaliumtransports eine ATPase ist. Erste biochemische Experimente mit Rohextrakten des Mitteldarmepithels konnten tatsächlich eine K^+ -stimulierbare ATPase-Aktivität nachweisen (Wolfersberger et al., 1982; Deaton, 1984). Dow et al. (1984) lokalisierten mit Hilfe von Röntgen-Mikroanalysen den aktiven Schritt der K^+ -Translokation in der apikalen Membran der Gobletzellen (=

GCAM). Diese Membran ist mit Portasomen besetzt (Cioffi & Wolfersberger, 1983). Cioffi und Wolfersberger (1983) entwickelten eine Methode die GCAM rein darzustellen und schufen damit die Voraussetzung für exakte biochemische Experimente. Wieczorek et al. (1986) fanden eine an die reine GCAM gebundene ATPase-Aktivität, die nicht mit Vanadat, Azid und Oligomycin zu hemmen ist. Die Aktivierung durch K^+ und andere einwertige Alkaliionen, sowie die Insensitivität gegen Ouabain nebst ihrer Lokalisation in der K^+ -transportierenden Membran als weitere Merkmale der ATPase, führten zu der der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese, daß diese ATPase die molekulare Grundlage und integraler Bestandteil der elektrogenen Kalium-Pumpe der Insekten ist. Um dies zu beweisen, muß man die ATPase-Aktivität solubilisieren und reinigen. Nach Rekonstitution in künstliche Lipidvesikel sollte ein aktiver ATP-abhängiger Ionentransport nachgewiesen werden können.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die K^+ -stimulierbare ATPase-Aktivität aus der Apikalmembran der Gobletzellen (= GCAM-ATPase) des Mitteldarmepithels der Raupen des Tabakschwärmers Manduca sexta zu solubilisieren und zu isolieren. Eine besondere Schwierigkeit war auch hier, wie allgemein bei biochemischen Arbeiten mit Insektengeweben, die geringe Materialmenge. Dieses Problem wurde z.T. durch die Präparation einer mit GCAM angereicherten Membranfraktion bewältigt (vgl. die Abschnitte 2.3.1 und 3.1.1). Außerdem wurden Methoden verwendet, die es ermöglichen, geringe Mengen an Protein, sowie in der ATPase-Reaktion gebildetes anorganisches Phosphat nachzuweisen.

Die Solubilisierung und Reinigung der GCAM-ATPase wurde mit folgender Strategie verfolgt:

- Es wurde nach geeigneten Lösungsmitteln, die die ATPase-Aktivität solubilisieren, gesucht. Die Bedingungen unter

denen das gelöste Enzym seine biologische Aktivität bewahrt, wurden bestimmt.

- Mehrere Methoden zur Reinigung der ATPase wurden getestet.
- Die Reinheit der ATPase wurde gelelektrophoretisch geprüft.
- Die Eigenschaften der gereinigten ATPase wurden untersucht und mit denen des membrangebundenen Enzyms verglichen.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren mindestens p.A. Qualität. Sie wurden von den Firmen Boehringer, Merck, Serva und Sigma bezogen.

Die nicht-ionischen Detergentien C₁₂E₁₀ und C₁₂E₉ stammten von Sigma, C₁₂E₈ von Nikko Chemicals (Tokyo) und β -Octylglycosid von Boehringer.

Standardeichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung (HMW- und LMW-kits) und ATP-Agarose waren Pharmacia-Produkte. Acrylamid, N,N-Methylenbisacrylamid, Tetramethyldiamin, SDS, Mercaptoethanol, Glycin waren von Serva.

2.2 Versuchstiere

In den Versuchen wurden Raupen des Tabakswärmers Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) mit einem Gewicht von 4.5 - 6.5 g (5. Larvenstadium) eingesetzt. Die Tiere wurden in eigener Zucht den Anleitungen von Bell und Joachim (1974) entsprechend gehalten.

2.3 Membranpräparationen

2.3.1 Präparation einer mit GCAM angereicherten Membranfraktion aus dem Mitteldarmepithel von Manduca sexta

Die Präparation einer mit GCAM angereicherten Membranfraktion (definiert in Abschnitt 3.1.1) wurde vereinfacht nach der Methode von Cioffi & Wolfersberger (1983) durchgeführt. In sämtlichen Schritten der Präparation wurde darauf geachtet, sowohl das Gewebe als auch die verwendeten Lösungen bei Temperaturen von 0-4 °C zu halten. Die Raupen wurden 20 min in Eis vorgekühlt, danach auf der Dorsalseite in der Medianen longitudinal eröffnet, und der Mitteldarm heraus-

genommen. Der posteriore Abschnitt des Mitteldarms wurde longitudinal aufgeschnitten, die Malpighischen Gefäße entfernt. Das stark aufgefaltete einschichtige Darmepithel ist in sechs Längsstreifen organisiert, die durch Längsmuskelstränge voneinander getrennt sind. Schneidet man entlang der Muskulatur und entfernt diese, läßt sich das Epithel durch vorsichtiges Ziehen mit einer Pinzette glätten. Die flachen Epithelstreifen wurden mit einer Mikroschere in annähernd quadratische Stücke von ca. 2-3 mm Kantenlänge geschnitten, das Material von 3-5 Raupen in ca. 5 ml 0.26 M Saccharose/5 mM Na-EDTA/ 5mM Tris-HCl, pH 8.1 (= SET) gesammelt und danach 10 sec auf niedrigster Stufe ultraschallt (Branson-Sonifier B-12 mit Mikrotip). Auf diese Weise wird der Mikrovillisaum der säulenförmigen Zellen (columnar cells) abgesprengt und deren Zellinhalt freigesetzt. Nach Waschen mit SET wurden die GCAM durch kräftige Pipettieren mit einer Pasteurpipette vom Epithel getrennt. Die Suspension wurde nun durch eine mit SET angefeuchtete vierlagige Mullbinde filtriert, die die groben Epithelbestandteile zurückhält. Das die GCAM enthaltende Filtrat wurde unverzüglich für 2 min bei 1200 - 2500 Upm (= 250 - 75 g_{av}) in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5C, SS 34-Rotor) zentrifugiert. Der vor allem Zellorganellen enthaltende Überstand wurde verworfen, das lockere Pellet, das vor allem aus GCAM besteht, auf einen 45-41-37%-Saccharosegradienten (w/w, Saccharose in 5 mM Na-EDTA/5 mM Tris-HCl, pH 8.1) aufgetragen und bei 25000 Upm (= 77000 g_{av}) im Ausschwingrotor über Nacht zentrifugiert (Sorvall OTD-55B, TH 641-Rotor). Von den drei im Gradienten erscheinenden Banden wurde die mittlere abgenommen, langsam und in Schritten mit 5 mM Na-EDTA/5 mM Tris-HCl (pH 8.1) insgesamt 1:5 verdünnt. Die Membransuspension wurde in der Kühlzentrifuge bei 9500 Upm (= 10000 g_{av} , Sorvall RC 5C, SS34-Rotor) 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet, das vor allem GCAM und an ihnen haftende Mitochondrien enthält, in SET resuspendiert und erneut, wie eben beschrieben, zentrifugiert. Danach wurde das Pellet zur Bestimmung membrangebundener ATPase-

aktivitäten in 5 mM MOPS-Tris/0.32 mM EGTA/3.2 mM Mercaptoethanol/0.1% BSA (pH 7.6) aufgenommen.

Membranfraktionen (Äquivalente von 8-12 präparierten Raupen), die zur Solubilisierung eingesetzt werden sollten, wurden nach der ersten 30-minütigen Zentrifugation in SET aufgenommen, 15 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge bei 20000 Upm (= 48000 g_{av} , SS 34-Rotor) zentrifugiert. Sie wurden als Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Regel bei -30°C über Wochen gelagert.

2.3.2 Rohextrakt des Mitteldarmepithels von *Manduca sexta*

Epithelstreifen wurden wie in 2.3.1 beschrieben gewonnen, das Gewebe anschließend in 300 µl SET aufgenommen und in einem Glashomogenisator (Duall 20) 3 min bei 4 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 5 mM MOPS-Tris/ 0.32 mM EGTA/ 3.2 mM Mercaptoethanol (pH 7.6) auf 5 ml verdünnt und bei 36000 Upm (= 102000 g_{av} , Sorvall OTD 55, T875Rotor) 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mM MOPS-Tris/0.32 mM EGTA/3.2 mM Mercaptoethanol/0.1 % BSA (pH 7.6) rehomogenisiert und ATPase-Aktivitäten bestimmt.

2.4 Solubilisierung

2.4.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Membranfraktion (frisch präpariert), Puffer und organische Lösungsmittel wurden zur Kühlung in Eis gestellt. Die mit GCAM angereicherte Membranfraktion (700-900 µg Protein/ml) wurde in 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 1.6 mM $NaNO_3$, 0.32 mM Na_3VO_4 , 3.2 mM Mercaptoethanol, 0.5 mM Tris-ATP resuspendiert (pH 8.1). Die Membransuspension (200 oder 400 µl) wurde 1 + 1 mit organischem Lösungsmittel (Dichlormethan oder Chloroform) versetzt und 5 min durch Aufziehen mit einer Kolbenhubpipette durchmischt. Die resultierende Emulsion wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 15 sec abzentrifu-

giert. Die organische Phase sowie die unlösliche Material enthaltende Zwischenphase wurden verworfen. Die obere wässrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und bei 20000 Upm (= 48000 g_{av}) in der Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5C, SS 34-Rotor 2 Stunden bei 4 °C zentrifugiert. Im klaren Überstand wurde die ATPase-Aktivität bestimmt.

2.4.2 Solubilisierung mit nicht-ionischen Detergentien

Tiefgefrorene Membranpellets (0.3-1.2 mg Protein, bei Präparationen für native PAGE bis zu 3.0 mg Protein) wurden bei 0-4 °C in 600-700 μ l 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 9.6 mM Mercaptoethanol (pH 8.1) resuspendiert und in Standardversuchen mit 0.3-1.0 ml 0.05-0.26% des milden nicht-ionischen Detergens $C_{12}E_{10}$, das im selben Puffer gelöst war, versetzt. Für die Solubilisierung von Protein und ATPase-Aktivität erwies sich das Verhältnis 2 mg Detergens/mg Protein als am günstigsten. Die Detergenskonzentration lag mit 0.05-0.26% über der kritischen Micellarkonzentration (10 μ g/ml, Esmann Skou, 1984). Unmittelbar nach Zugabe von Detergens zur trüben Membransuspension erhält man eine klare Lösung, eine längere Inkubation ist nicht notwendig. Nach Zentrifugation bei 36000 Upm (= 102000 g_{av} , Sorvall OTD-55B, T875-Rotor) für 60 min bei 4 °C wurden im Überstand und im gelb-braunen Pellet ATPase-Aktivität und Proteingehalt bestimmt. In Vorversuchen wurden als weitere nicht-ionische Detergentien $C_{12}E_8$, $C_{12}E_9$ und β -Octylglycosid verwendet.

2.5 Dichtegradienten-Zentrifugationen

0.7 ml des normalerweise mit $C_{12}E_{10}$ solubilisierten Überstands wurden auf 4.8 ml eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten (10-50%, je 1 ml 50%, 40%, 30%, 20% und 0.8 ml 10% Saccharose, gelöst in 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 9.6 mM Mercaptoethanol, 0.01% $C_{12}E_{10}$, pH 8.1) aufgetragen. Der Gradient wurde bei 50 000 Upm (= 220000 g_{av} , Sorvall OTD-55B TV 865-Vertikalrotor) 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach

wurden fünf Fraktionen von oben mit einer Kolbenhubpipette abgenommen: 2 x 0.75 ml und 3 x 1.0 ml.

In einigen Versuchen wurde 1 ml 30%-Saccharose-Fraktion des eben beschriebenen Dichtegradienten auf einen zweiten (80-40% Saccharose, 10%-Stufen) aufgetragen und nochmals bei 50000 Upm zentrifugiert. Danach wurden Fraktionen wie oben beschrieben gewonnen.

2.6 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die verwendete FPLC-Apparatur der Firma Pharmacia (Freiburg) besteht aus zwei Präzisions-Doppelkolbenpumpen P-500, die von einem Gradientenprogrammer GP-250 gesteuert werden, sowie einem 7-Wege-Ventil V7.

Die aus der Dichtegradienten-Zentrifugation des Überstandes stammenden Fraktionen (meist 30% Saccharose) wurden zunächst in dem Mikrokonzentrator Centricon C (Amicon) konzentriert und davon 500 µl (50 - 200 µg Protein) auf die stark basische Mono Q-Säule (1 ml) gepumpt (1 ml/min). Die Säule war in 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 9.6 mM Mercaptoethanol, 0.01% C₁₂E₁₀ (pH 8.1) äquilibriert und wurde mit 2 ml dieses Puffers nach dem Probenauftrag gewaschen. Es wurde üblicherweise mit einem Gradienten mit linear ansteigender NaCl-Konzentration von 0 bis 1 M NaCl eluiert.

2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

2.7.1 SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden in Minigelen (8 x 8 cm, 1 mm Schichtdicke) nach der Methode von Laemmli (1970) mit einer Minigel-Elektrophoreseapparatur (Biometra) durchgeführt. Sammelgel mit T 5% / C 2.5%, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, Trenngel mit T 17.5% / C 0.4%, 330 mM Tris-HCl pH 8.7. Gel- und Laufpuffer (12.1 g Tris, 7.5 g Glycin/l) enthielten 0.1% SDS. Die Proteinproben wurden mit 0.1-2%

Mercaptoethanol als reduzierendem Agens, 2% SDS, 0.004% Bromphenolblau und, wo nötig, 5% Saccharose (alles Endkonzentrationen) versetzt und danach ca. 5 min in 100 °C (Wasserbad) gekocht. Es wurden 5-20 µl in der Regel mit Centricon 10 (Amicon) ankonzentrierte Probe (0.3-0.5 µg Protein/µl) auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese war nach 60 min (max. 250 V; 10 min, 10 mA; 50 min, 30 mA) beendet. Proteinbanden wurden mit 0.25% Coomassie Brilliant Blue (R-250) in 10% Eisessig/50% Methanol gefärbt, sukzessiv mit 10% Eisessig/25% Isopropanol und mit 7.5% Eisessig/5% Methanol entfärbt.

2.7.2 Native PAGE

Die native PAGE wurde in der oben angegebenen Apparatur durchgeführt. Ein linear ansteigendes Gradientengel (T 3% - 15%, C 3%, 400 mM Tris-HCl, 3% Glycerin, 0.2% β -Octylglycosid, pH 8.7) wurde mit einem Sammelgel (T 3%, C 0.3%, 32 mM Tris-HCl, 3% Glycerin, 0.2% β -Octylglycosid, pH 6.8) überschichtet. Die mit Centricon 10 (Amicon) konzentrierten 30% Saccharose-Fraktionen aus der Dichtegradienten-Zentrifugation (0.2-0.4 mg Protein, 600 µl) wurden auf die gesamte Geloberfläche aufgetragen. Die Elektrophorese war nach 60 min (max. 250 V, 20 mA) beendet. Im Anschluß wurden an den Rändern und aus der Mitte des Gels in der Vertikalen schmale Streifen ausgeschnitten, Proteinbanden mit Coomassie Blue angefärbt und an der ursprünglichen Stelle wieder eingefügt, um die Position der Proteinbanden im nicht gefärbten Gel zu identifizieren. Die Proteinbanden wurden nun als horizontale Streifen aus dem ungefärbten Gel ausgeschnitten, danach in einem Glashomogenisator (Duell 20) in 1 ml 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 9.6 mM Mercaptoethanol 30% Saccharose, 0.01% $C_{12}E_{10}$ (pH 8.1) homogenisiert. Zur Elution des Proteins aus dem Gel wurde die Suspension im Eppendorfgefäß über Nacht in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Die Gelmatrix wurde kurz in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand abgenommen.

2.7.3 Microgradientengele (μ PAGE)

Native Mikrogradientengele (Rüchel et al., 1973; Klein, 1987) von ca. 1%-33% (T) Acrylamid (2.5% C) mit 0.1% β -Octylglycosid wurden in 10 μ l Glaskapillaren angesetzt. Aufgetragene 50-100 ng Protein in 0.5-20 μ l genügen zum Nachweis von Proteinbanden (mittels Coomassie Blue) im Gel. Zur Untersuchung der ATPase-Aktivität wurden Gele nach der Elektrophorese in 500 μ l Substratlösung (100 mM Tris-HCl pH 8.4, 5 mM Na_2ATP , 5 mM MgSO_4 , 2.5 mM Pb-Acetat) mindestens 60 min bei 35 °C inkubiert. Das in der ATPase-Reaktion gebildete P_i wurde als weißes Bleisalz ausgefällt und nach Inkubation (1 min) in 2% Ammoniumsulfid als braunes PbS sichtbar gemacht. Glykoproteinfärbung wurde mit PAS (Zacharius et al., 1969) durchgeführt.

2.8 ATPase-Tests

2.8.1 Membrangebundene ATPase

Standardansätze (Endvolumen 160 μ l) zur Bestimmung der membrangebundenen Enzymaktivität enthielten ca. 10 μ g Protein/ml aus der mit GCAM angereicherten Membranfraktion, 50 mM Tris/MOPS, 1 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 1 mM Tris-ATP, 0.1 mM EGTA, 1 mM Mercaptoethanol, 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 0.03% BSA. Der pH-Wert wurde mit Tris (Base) auf 8.0 eingestellt. Die Ansätze wurden ohne Substrat 10-20 min bei 30 °C vorinkubiert, die Reaktion wurde durch die Zugabe von Substrat gestartet. Für gewöhnlich betrug die Inkubationszeit 12 min bei einer Temperatur von 30 °C. Die Reaktion wurde durch schnelles Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Sämtliche Ansätze wurden als Dreifach-Werte getestet, die Werte für Enzymaktivitäten durch die Bestimmung von Werten zur Zeit 0 min korrigiert. Die ATP-Hydrolyse ist eine lineare Funktion von Zeit und Proteinkonzentration.

Die bei -30°C gelagerten Membranfraktionen, die das Ausgangsmaterial für die Solubilisierung bildeten, wurden in 16 mM Tris-HCl, 0.32 mM EDTA, 9.6 mM Mercaptoethanol (pH 8.1) resuspendiert, da bei der Anionenaustauscher-Chromatographie keine anionischen Puffer (MOPS!) verwendet werden sollten. Als Folge davon enthielten die Versuchsansätze 5 mM Tris + 50 mM Tris/MOPS. Die Konzentration von β -Mercaptoethanol wurde um den Faktor 3 erhöht, nachdem die Sensitivität der ATPase-Aktivität gegenüber N-Ethylmaleimid bekannt war (vgl. Abschnitt 3.1.4).

2.8.2 Solubilisierete ATPase

Die solubilisierete ATPase-Aktivität wurde standardmäßig in Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems gemessen, da nur so Linearität der Hydrolyserate von ATP in der Zeit gemessen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die Ansätze wurden ohne Substrat 5-10 min vorinkubiert, die Reaktion anschließend durch die Zugabe von Substrat gestartet. Standardansätze (Endvolumen 160 μl) wurden bei 30°C bis zu 18 min inkubiert. Sie enthielten 5-80 μg Protein/ml, 5 mM Tris-HCl oder 5 mM Tris-HCl + 50 mM Tris/MOPS, 3 mM β -Mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 0.003% $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$, 2 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 1 mM Tris-ATP, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 3 U/ml Pyruvatkinase, 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 (pH 8.1). In den Experimenten, die ohne KCl im Testansatz durchgeführt werden mußten, war es aufgrund der K^+ -Abhängigkeit der Pyruvat-Kinase nicht möglich, das ATP-regenerierende System einzusetzen. In allen Fällen bestand jedoch eine lineare Beziehung zwischen der Produktion von P_i und der Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 3.4).

2.9 Phosphat-Nachweis

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde die Menge des aus der ATP-Hydrolyse freigesetzten anorganischen Phosphats nach der bei Wieczorek (1982) beschriebenen Methode gemessen. Eine zu bestimmende tiefgefrorene Probe von 160 μ l (Versuchsansatz) wurde mit 50 μ l 20% TCA versetzt und im Wasserbad (70 $^{\circ}$ C) aufgetaut. Nach 1-minütiger Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurden der Probe nach insgesamt 3.5 min 60 μ l entnommen und diese zu 100 μ l "Phosphatreagens" (2.4% H_2SO_4 , 60 mM Na-Molybdat) pipettiert. 15 sec danach wurden 30 μ l Malachitgrün (7.4% in gesättigtem Polyvinylalkohol) zupipettiert (das anorganische Phosphat bildet mit Molybdat einen Komplex, an den Malachitgrün gebunden wird). Nicht-komplexiertes Malachitgrün wurde nach weiteren 2 min durch Zugabe von 200 μ l 7.8% H_2SO_4 zerstört. Die Extinktion des Gesamtkomplexes wurde nach weiteren 60-120 min bei 625 nm photometrisch bestimmt (Hitachi 150-20). 4 nMol des in der ATPase-Reaktion gebildeten P_i ergeben hierbei eine Extinktion von etwa 0.3.

2.10 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard mit der Amidoschwarz-Methode nach Popov et al. (1975) bei 10-fach geringerem Volumen bestimmt. Membranen bzw. solubilisiertes Protein wurden mit Amidoschwarz (3,9 mg in 300 μ l 10% Eisessig/90% Methanol) angefärbt, in 10% Eisessig/90% Methanol entfärbt und danach in 350 μ l 0,1 N NaOH aufgenommen. 2 μ g des mit Amidoschwarz gefärbten BSA ergeben eine Extinktion von etwa 0.15 bei 615 nm.

Die vorhergehende Solubilisierung von Membranen mit Solubilizer (Wieczorek, 1982) erwies sich als nicht notwendig, da das im letzten Schritt verwendete NaOH das angefärbte Membranmaterial vollständig auflöste. Vergleichende Kontrollmessungen (Solubilizier vs NaOH) ergaben dieselben Proteinwerte. Der Proteingehalt wurde nicht nach den Methoden von Lowry (1951) oder Bradford (1976) bestimmt, weil sie relativ unempfindlich (Lowry) bzw. anfällig (Bradford) gegen verschiedene in der Enzymreaktion verwendete Substanzen (z.B. Detergentien) sind. Die Amidoschwarz-Methode hingegen ist völlig unempfindlich gegen 5% Triton und Detergentien in hohen Konzentrationen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Eigenschaften der membrangebundenen GCAM-ATPase

3.1.1 Charakterisierung der mit GCAM angereicherten Membranfraktion

Der Intention, die K^+ -stimulierbare ATPase der GCAM zu solubilisieren und zu reinigen, stand mit der zwar hohen spezifischen Aktivität, aber extrem geringen Ausbeute an Protein bei der Präparation reiner GCAM (vgl. Tab. 1 und Wieczorek et al., (1986)) eine erhebliche Schranke entgegen. Dieser Mangel sollte durch eine modifizierte Art der Membranpräparation (vgl. Abschnitt 2.3.1) behoben werden, die zu einer größeren Proteinausbeute bei nicht allzu großem Verlust an spezifischer Aktivität führt. Die Membranfraktion bezeichne ich bereits an dieser Stelle als eine mit GCAM angereicherte. Gründe für den berechtigten Gebrauch dieses Terminus werden in diesem ersten Kapitel angeführt.

Der Vergleich der Ausbeuten an Protein und ATPase-Aktivitäten (Tab. 1) in Rohextrakten des Manduca-Mitteldarmepithels, in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion und der reinen GCAM soll dazu verhelfen, Vor- und Nachteile der modifizierten Art der Membranpräparation abzuwägen. Die ATPase-Aktivität in der mit GCAM-angereicherten Membranfraktion und des Rohextrakts wurden in Anwesenheit von Azid, einem typischen Hemmstoff der mitochondrialen ATPase (Mitchell & Moyle, 1971; Moyle & Mitchell, 1975) und Vanadat, einem typischen Hemmstoff von ATPasen, die in ihrem Reaktionszyklus stabile Phospho-Enzym-Zwischenprodukte bilden (Macara, 1980), bestimmt. Beide Hemmstoffe haben praktisch keinen Einfluß auf die Enzymaktivität in reinen GCAM (Wieczorek et al., 1986). Die mit GCAM angereicherte Membranfraktion enthält als Verunreinigung mitochondriale und unspezifische Phosphatase-Aktivität (Tab. 2). Azid hemmt die spezifische Aktivität ATP-spaltender Enzyme um 20%, Vanadat die Azid-insensitive ATPase-Aktivität um etwas mehr als 10%.

Tab. 1: ATPase-Aktivitäten in Rohextrakt, GCAM angereicherter Membranfraktion und GCAM.

Standardansätze für die Bestimmung der ATPase-Aktivität in Rohextrakt (n = 4) und mit GCAM angereicherter Membranfraktion (n = 12) mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1 mM Na_3VO_4 . Gesamtaktivitäten ausgedrückt als $\mu\text{Mol/Larve} \times \text{h}$, der Proteingehalt ist in μg angegeben (Mittelwerte $\pm$ S.D.). Werte für reine GCAM wurden aus Wieczorek et al. (1986) übernommen (= BBA).

	Protein/Larve	Gesamt- aktivitäten
Roh-extrakt	1710 $\pm$ 253	12.6 $\pm$ 0.7
GCAM anger. Membr.	36 $\pm$ 10	2.3 $\pm$ 0.1
GCAM (BBA)	4.4	0.38
GCAM anger.	8	6
GCAM (BBA)		

Tab. 2: Spezifische ATPase-Aktivitäten in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion.

Spezifische Aktivität in $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.) aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen) mit je verschiedene Membranpräparationen. Standardansätze mit/ohne 0.5 mM NaN_3 , mit/ohne 0.1 mM Na_3VO_4 .

Hemmstoffe	spez. Aktivität
-	103 $\pm$ 20
0.5 mM NaN_3	81 $\pm$ 14
0.5 mM NaN_3 /	71 $\pm$ 12
0.1 mM Na_3VO_4	

Die mit GCAM angereicherte Membranfraktion ist im Hinblick auf die beabsichtigte Solubilisierung der mit Alkaliionen stimulierbaren ATPase ein akzeptables Ausgangsmaterial. Ein Vergleich von Proteingehalt und Gesamtaktivitäten im Rohextrakt des Mitteldarms und in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion verdeutlicht die Güte der Membranpräparation. Während 98% des Proteins abgetrennt werden, findet man ca. 20% der Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase-Aktivität wieder. Die Präparation reiner GCAM ist unter dem genannten Aspekt kein Fortschritt, da die Ausbeute an Protein sehr gering ist. Zudem konnte in einem späteren Schritt der Mangel der mit GCAM angereicherten Membranfraktion, die darin enthaltenen Fremd-ATPase-Aktivitäten (Tab. 2), durch die Charakteristik der solubilisierten ATPase-Aktivitäten aufgehoben werden (vgl. Abschnitt 3.2.5).

Die gemessenen Azid- und Vanadat-insensitiven spezifischen ATPase-Aktivitäten sind um ca. 20% kleiner als die von Wieczorek et al. (1986) mit reinen GCAM bestimmten, was auf die in der Membranfraktion vorhandenen Fremdaktivitäten und Fremdproteine zurückzuführen ist. Neben 0.5 mM Azid führen 1.5 mM Azid zu keiner stärkeren Inhibierung der mitochondrialen ATPase-Aktivität und 0.1 mM Vanadat reichen zur Hemmung der unspezifischen Phosphatase-Aktivität aus. Aufgrund der hier beschriebenen Charakteristik und des Vergleichs mit Rohextrakt und reinen GCAM erscheint es berechtigt, die in allen folgenden Experimenten eingesetzte Membranfraktion als eine mit GCAM angereicherte Membranfraktion und die in ihr enthaltene Azid- und Vanadat-insensitive ATPase-Aktivität als GCAM-ATPase zu bezeichnen. Die Eigenschaften der GCAM-ATPase mußten bestimmt werden, um sicher zu sein, daß sie dieselben wie die ATPase-Aktivität in reinen GCAM besitzt. Zudem sollten sie später mit den Eigenschaften der gereinigten GCAM-ATPase verglichen werden.

3.1.2 KCl-Abhängigkeit

Die GCAM-ATPase-Aktivität zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der KCl-Konzentration (Abb. 1). Die Enzymaktivität ist halbmaximal zwischen 10 und 20 mM KCl, maximal bei etwa 50 mM KCl. Die KCl-Aktivierung erreicht dort den Faktor 2.5 verglichen mit der Mg^{2+} -abhängigen Grundaktivität und nimmt mit steigender KCl-Konzentration wieder ab. Die ATPase-Aktivität ist bei sämtlichen KCl-Konzentrationen absolut an die Anwesenheit von Mg^{2+} gebunden.

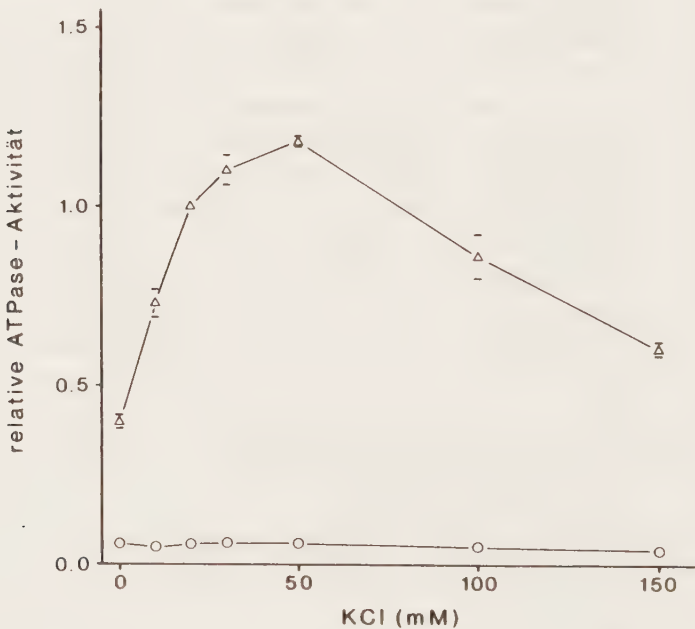


Abb. 1: KCl-Abhängigkeit der GCAM-ATPase-Aktivität.

Standardansätze mit verschiedenen KCl-Konzentrationen, sowie mit (Δ) und ohne (O) 1 mM $MgCl_2$. Die spezifische Aktivität für 1.0 ist $77 \pm 4 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen (Mittelwerte $\pm$ S.D.).

3.1.3 Substrat-Spezifität

Die Wirkung verschiedener Nukleotide auf die Aktivität der GCAM-ATPase zeigt die Tabelle 3. Die Purinnukleotide ATP und GTP sind als die effektivsten Substrate gleich wirksam. Die Pyrimidinnukleotide CTP und UTP verhalten sich unterschiedlich. Während UTP etwa 40% der ATP-Wirkung erreicht, wird CTP kaum gespalten. ADP und AMP sind keine Substrate der ATPase.

Tab. 3: Substrat-Spezifität der GCAM-ATPase-Aktivität. Standardansätze mit 1 mM Substratkonzentrationen und 1 mM $MgCl_2$. Spezifische Aktivität des 100%-Werts: $63 \pm 8 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Substrat	relative Aktivitäten
ATP	100
GTP	95 ± 2
UTP	38 ± 2
CTP	10 ± 1
ADP	5 ± 1
AMP	0

3.1.4 Inhibitor-Sensitivität

Die Charakteristik der Wirkung von Azid und Vanadat auf Enzymaktivitäten in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion wurde bereits dargestellt (Tab. 2). Der verbliebene Anteil der Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase-Aktivität wurde mit weiteren spezifischen Inhibitoren untersucht (Tab. 4): Oligomycin und DCCD in geringen Konzentrationen, neben Azid typische Hemmstoffe der mitochondrialen ATPase (Kagawa & Racker, 1966; Bulos & Racker, 1968) und 150 μM DCCD sowie NEM (N-Ethylmaleimid) als Hemmstoff von H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen (Mellman et al., 1986; Sze, 1985). Die Alkali-Ionenpumpe des Mitteldarmepithels ist nicht mit Ouabain, dem spezifischen Hemmstoff der $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Robinson & Flashner, 1979) hemmbar (Harvey & Zerahn, 1971). Da Ouabain weder im Roh-extrakt noch in reinen GCAM ATPase-Aktivitäten hemmt (Wieczorek et al., 1986), wurde seine Wirkung an dieser Stelle nicht getestet.

Oligomycin hemmt die Aktivität der GCAM-ATPase um ca. 15%, während 1.5 μM DCCD keinerlei Einfluß ausüben. Damit ist ausgeschlossen, daß in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion eine durch Azid nicht hemmbare mitochondriale ATPase-Aktivität existiert, und umgekehrt gesichert, daß Oligomycin und 1.5 μM DCCD keine Hemmstoffe der GCAM-ATPase sind. Hemmstoffe der GCAM-ATPase hingegen sind 150 μM DCCD, das die Enzymaktivität um ca. 90% reduziert und NEM, das wegen seiner prominenten Stellung innerhalb der Reihe der getesteten Hemmstoffe gesondert dargestellt wird.

Tab. 4: Inhibitor-Sensitivität der GCAM-ATPase-Aktivität. Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1 mM Na_3VO_4 . Spezifische Aktivität des 100%-Werts: $63 \pm 14 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$. DCCD und Oligomycin wurden in Ethanol gelöst, die Membranfraktion damit 10 min bei RT inkubiert, danach die Reaktionen gestartet. Kontrollwerte enthielten dieselbe Menge Ethanol, das keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Hemmstoff	relative Aktivitäten
-	100
Oligomycin (20 $\mu\text{g/ml}$)	86 ± 6
1.5 μM DCCD	101 ± 6
150 μM DCCD	7 ± 3

Die Wirkung von N-Ethylmaleimid (NEM)

Der sehr wirksame Hemmstoff der H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen, das N-Ethylmaleimid, reagiert kovalent mit SH-Gruppen von Proteinen, wobei ein stabiler Thioether gebildet wird (Riordan & Vallee, 1972). Um die Wirkung von NEM zu testen, ist es notwendig, die Membranfraktion sowohl mit, als auch ohne das SH-Schutzgruppenreagens β -Mercaptoethanol zu inkubieren (vgl. die Legende zu Abb. 2). Bemerkenswert ist, daß die spezifische Aktivität der ATPase in den Inkubationsansätzen ohne NEM und ohne β -Mercaptoethanol um 30% sinkt verglichen mit denjenigen mit β -Mercaptoethanol (Legende Abb. 2). Die GCAM-ATPase-Aktivität wird bereits mit 0.3 μM NEM deutlich gehemmt. Weniger als 1 μM NEM führen zu 50% Inhibition, die mit 3-10 μM vollständig ist.

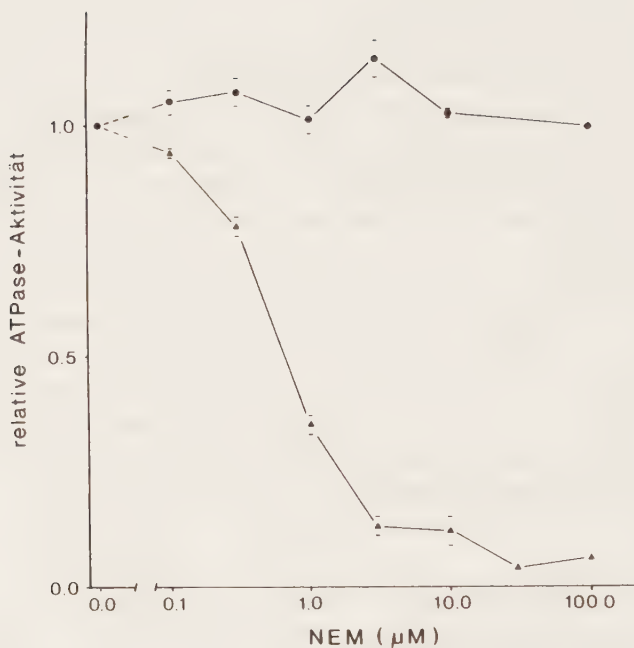


Abb. 2: Die Wirkung von NEM auf die GCAM-ATPase-Aktivität. Die angegebenen NEM-Konzentrationen (0-100 µM) wurden im ATPase-Test erreicht. Die Membranfraktionen wurden mit (●) und (▲) ohne β -Mercaptoethanol mit 3.2-fach höheren als den angegebenen NEM-Konzentrationen 30 min bei RT (23 °C) inkubiert. Danach wurde die ATPase-Reaktion mit Substrat gestartet. Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1mM Na_3VO_4 . Spezifische Aktivitäten der 1.0-Werte in den Ansätzen mit Mercaptoethanol: $61 \pm 17 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$, in den Ansätzen ohne β -Mercaptoethanol: $42 \pm 12 \mu\text{Mol/Mg} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen. 30 und 100 µM NEM wurden nur in einem Versuch getestet.

3.1.5 Salz-Selektivität

Aus physiologischen Experimenten an der Alkali-Ionenpumpe im Mitteldarm von Schmetterlingsraupen ist deren geringe Selektivität bekannt, da neben K^+ auch andere einwertige Ionen aktiv transportiert werden (Harvey & Zehran, 1971). Aus diesem Grund war zu vermuten, daß auch die GCAM-ATPase, sollte sie die molekulare Grundlage der Alkali-Ionenpumpe darstellen, neben K^+ durch diese Alkalimetalle aktiviert werden kann. Diese Annahme wurde durch Variation einer Reihe ein- und zweiwertiger Kationen sowie der Anionen untersucht (Tab. 5).

1) Die Wirkung einwertiger Kationen.

In Anwesenheit von 30 mM KCl steigt die basale Mg^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität um den Faktor 2.5. Auch alle anderen getesteten einwertigen Kationen erhöhen die Enzymaktivität, am stärksten NH_4^+ und Rb^+ , deren Wirkung mit der von K^+ vergleichbar ist. Die geringsten Wirkungen zeigen Li^+ und Na^+ mit einer Erhöhung der Grundaktivität um den Faktor 1.95 bzw. 1.75.

2) Die Wirkung zweiwertiger Kationen.

Die getesteten zweiwertigen Kationen haben im Unterschied zu den einwertigen aktivierende und hemmende Wirkung. Während 30 mM Mg^{2+} aktivieren, hemmen 30 mM Ca^{2+} und 30 mM Mn^{2+} . Verringert man die Konzentration der zweiwertigen Kationen auf 15 mM, so aktiviert Mg^{2+} noch etwas deutlicher, Ca^{2+} ist nahezu ohne Wirkung und Mn^{2+} behält den hemmenden Einfluß.

3) Die Wirkung von Anionen.

Die Halogen-Anionen Br^- und Cl^- beeinflussen die ATPase-Aktivität nicht. Das F^- , ein Hemmstoff der H^+/K^+ -ATPase in der Plasmamembran der Magenschleimhaut (Sachs et al., 1976),

vermag die Enzymaktivität um ca. 10% zu steigern. HCO_3^- , ein sehr effektiver Aktivator der mitochondrialen ATPase (Ebel & Lardy, 1975), hat geringe hemmende Wirkung. NO_3^- , ein effektiver Hemmstoff der V-Typ-ATPasen (Mellman et al., 1986), hemmt die GCAM-ATPase.

Tab. 5: Salz-Selektivität der GCAM-ATPase-Aktivität. Standardansätze mit verschiedenen Salzen in den angegebenen Konzentrationen. Spezifische Aktivität des 100%-Werts: $73 \pm 14 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwert $\pm$ S.D.). Drei voneinander unabhängige Versuche mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Salz	relative Aktivitäten
-	40 $\pm$ 4
30 mM KCl	100
30 mM RbCl	111 $\pm$ 7
30 mM NH_4Cl	112 $\pm$ 4
30 mM LiCl	78 $\pm$ 3
30 mM NaCl	70 $\pm$ 4
30 mM MgCl_2	60 $\pm$ 9
15 mM MgCl_2	75 $\pm$ 12
30 mM CaCl_2	30 $\pm$ 5
15 mM CaCl_2	47 $\pm$ 8
30 mM MnCl_2	11 $\pm$ 1
15 mM MnCl_2	12 $\pm$ 1
30 mM KBr	104 $\pm$ 2
30 mM KF	110 $\pm$ 3
30 mM KHCO_3	89 $\pm$ 4
30 mM KNO_3	39 $\pm$ 5

3.1.6 ATP-Abhängigkeit

Die Aktivität der GCAM-ATPase in Abhängigkeit steigender ATP-Konzentrationen wurde unter dem Einfluß verschiedener KCl-Konzentrationen (0, 20, 50 und 150 mM) gemessen (Abb. 3). Die ATPase-Aktivität steigt bei allen KCl-Konzentrationen mit steigender ATP-Konzentration. Lediglich bei der sehr hohen ATP-Konzentration von 17.5 mM ATP fällt die Enzymaktivität in Anwesenheit von KCl. Bei ATP-Konzentrationen zwischen 0.3 und 7 mM aktivieren 20 und 50 mM KCl die ATPase-Aktivität ca. 2-fach, während 150 mM KCl die Basis-Aktivität nicht erhöht.

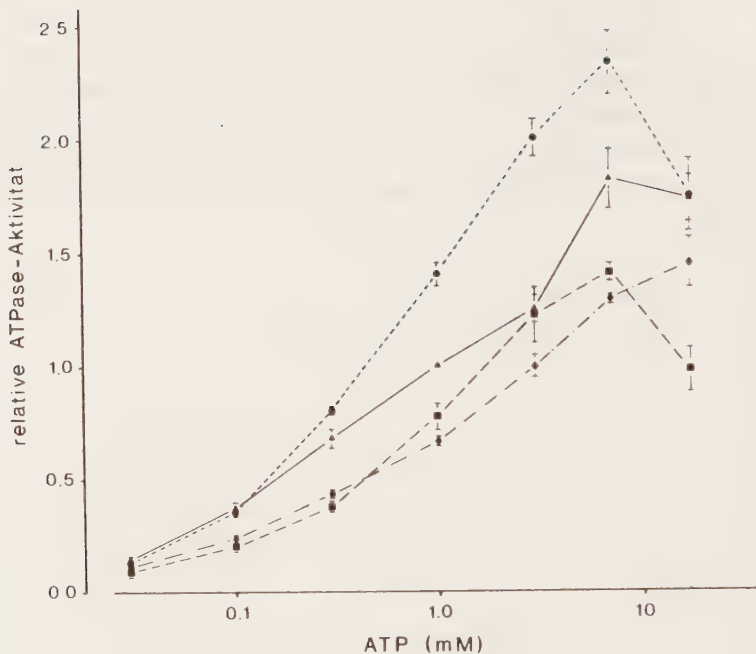


Abb. 3: ATP-Abhängigkeit der GCAM-ATPase-Aktivität.

Standardansätze mit verschiedenen ATP-Konzentrationen und 0 (◆), 20 mM (▲), 50 mM (●) und 150 mM (■) KCl. Die Konzentration von MgCl_2 liegt stets 1 mM über der ATP-Konzentration, so daß die MgATP^{2-} -Konzentration nur gering von der ATP-Gesamtkonzentration abweicht (Storer & Cornish-Bowden, 1976). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Membranpräparationen. Die spezifische Aktivität für 1.0 beträgt $59 \pm 6 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwert $\pm$ S.D.).

3.2 Solubilisierung der GCAM-ATPase-Aktivität

3.2.1 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Sowohl Chloroform als auch Dichlormethan waren für die Solubilisierung der GCAM-ATPase-Aktivität nicht geeignet. Mit beiden organischen Lösungsmitteln beträgt die Ausbeute an gelöster ATPase-Aktivität etwa 1% der Gesamtaktivität der membrangebundenen GCAM-ATPase (Tab. 6). Der Grund für die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich eine Inaktivierung des Enzyms durch vollständige Delipidation und eine damit verbundene Konformationsänderung des Proteins.

Tab. 6: Extraktion der GCAM-ATPase-Aktivität mit Dichlormethan und Chloroform.

Dargestellt sind Gesamtaktivitäten (nMol/Larve x h) aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen (Mittelwerte $\pm$ S.D.), sowie die Gesamtaktivität der membrangebundenen GCAM-Aktivität aus Tab. 1. Versuchsansätze siehe "Material und Methoden".

Gesamtaktivitäten	
GCAM anger.	2300 $\pm$ 100
Membranfraktion	
Dichlormethan	22 $\pm$ 7
Chloroform	32 $\pm$ 12

3.2.2 Ausgangsmaterial der Solubilisierung mit Detergentien

Ausgangsmaterial der Experimente zur Solubilisierung der GCAM-ATPase-Aktivität mit Detergentien war zwar die im vorhergehenden Abschnitt charakterisierte mit GCAM angereicherte Membranfraktion. Jedoch konnten wegen des zu erwartenden größeren Bedarfs an Protein die Membranen nicht frisch verwendet werden, sondern mußten als Pellets in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, gesammelt und bis zu ihrer Verwendung über Wochen bei -30°C gelagert werden. So konnten sie in beliebiger Menge dem jeweiligen Bedarf an Ausgangsmaterial entsprechend in den Experimenten eingesetzt werden.

Die Güte der tiefgefrorenen Membranpräparationen bezüglich der spezifischen Aktivität der GCAM-ATPase sowie der relativen Anteile Azid- und Vanadat-sensitiver Enzymaktivitäten ist in Tabelle 7 dargestellt. Die spezifische Aktivität der Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase beträgt jetzt ca. 40% derjenigen frischer Membranen. Der Anteil der "Fremd-ATPase-Aktivität" ist höher als bei frischen Membranen und liegt bei ca. 50% der gesamten ATP spaltenden Enzym-Aktivitäten. Anscheinend wird die mitochondriale ATPase-Aktivität weniger inaktiviert als die durch Vanadat hemmbare und die GCAM-ATPase-Aktivität.

Tab. 7: Spezifische ATPase-Aktivitäten in tiefgefrorenen, mit GCAM angereicherten Membranfraktionen.

Spezifische Aktivitäten ausgedrückt als $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$, der Proteingehalt ist $22 \pm 10 \mu\text{g/Larve}$ in 7 voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen (Mittelwerte $\pm$ S.D.). Standardansätze mit/ohne 0.5 mM NaN_3 , mit/ohne $0.1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$.

Hemmstoff	spez. Aktivitäten
-	58 ± 5
0.5 mM NaN_3	35 ± 7
$0.5 \text{ mM NaN}_3/$	28 ± 6
$0.1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$	

3.2.3 Solubilisierung mit Polyoxyethylen-10-Laurylether

Im Unterschied zu den organischen Lösungsmitteln konnte die GCAM-ATPase mit milden, nicht-ionischen Detergentien solubiliert werden. C_{12}E_8 , C_{12}E_9 , $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ (Polyoxyethylen-10-Laurylether) und β -Octylglycosid glichen einander in ihrer Fähigkeit membrangebundene ATPase-Aktivität zu solubilisieren. Wegen des günstigsten Preis-Leistungsverhältnisses wurde routinemäßig $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ verwendet. In Vorversuchen wurde ein Verhältnis von $2 \text{ mg C}_{12}\text{E}_{10}/\text{mg Protein}$ als für die Solubilisierung der GCAM-ATPase am günstigsten ermittelt.

In Tab. 8 sind die Werte zur Charakteristik der Solubilisierung mit $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ zusammengefaßt. Wird das Detergens in den oben angegebenen Verhältnissen eingesetzt, werden etwa drei Viertel des Membranproteins solubilisiert. Die spezifische Aktivität der solubilisierten ATPase steigt um den Faktor 5 im Vergleich zu derjenigen der membrangebundenen auf etwa $140 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ und damit in weit größerem Maß als der Gesamtproteingehalt sich verringert. Im unlöslichen Membranmaterial des Pellets finden sich etwa 10% der Aktivität des Über-

stands. Die Erhöhung der Gesamtaktivität der löslichen ATPase um den Faktor 3-4 verglichen mit der membrangebundenen könnte durch drei Faktoren bedingt sein:

- a) durch die in Lösung in vermehrter Anzahl zugänglichen ATPase-Moleküle,
- b) durch die gestiegene Umsatzgeschwindigkeit der ihrer natürlichen Membranumgebung entzogenen und so möglicherweise durch Detergens aktivierten GCAM-ATPase,
- c) durch die Aktivierung mit Tris (vgl. Tab. 15).

Tab. 8: Vergleich von membrangebundener, solubilisierter (Überstand) und unlöslicher (Pellet) GCAM-ATPase-Aktivität. Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1 mM Na_3VO_4 . Spezifische Aktivität in $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$, Gesamtaktivität in $\mu\text{Mol/Larve} \times \text{h}$, Proteingehalt 100% = 0.2-0.7 mg (Mittelwerte $\pm$ S.D., sieben voneinander unabhängige Versuche mit verschiedenen Membranpräparationen).

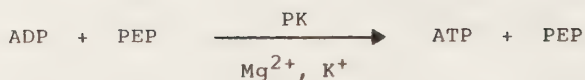
	Membranfraktion	Überstand	Pellet
Protein	100	73 $\pm$ 5	27 $\pm$ 5
spez. Aktivität	29 $\pm$ 6	139 $\pm$ 30	21 $\pm$ 10
Gesamtaktivität	0.7 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.1

3.2.4 Exkurs: ATP-regenerierendes System

Es hatte sich in ersten Versuchen zur Solubilisierung gezeigt, daß man zwar die GCAM-ATPase-Aktivität sehr wirksam in Lösung bringen kann, daß die Produktion von Phosphat jedoch keine lineare Funktion der Inkubationszeit mehr war. Ich habe deshalb mehrere Verfahren angewendet, die sich zur Stabilisierung der Aktivität anderer ATPasen als nützlich erwiesen haben.

- 1) Die Zugabe größerer Mengen von Albumin aus Rinderserum, das die Aktivität der $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase stabilisiert (Esmann et al., 1979), wahrscheinlich indem es Detergens bindet (Helenius & Simons, 1975)
- 2) Der Einsatz von Glyzerin in unterschiedlicher Konzentration (25 und 40%), dessen stabilisierender Effekt an verschiedenen ATPase-Systemen genutzt wurde (O'Neil & Spanswick, 1984; Esmann, 1984; Martins & de Meis, 1985; Randall & Sze, 1986).
- 3) Das Absenken der Temperatur im Inkubationsansatz von 30 °C auf 23 °C.
- 4) Variation der Detergengkonzentration bei gleichbleibender Proteinkonzentration, sowie die des Verhältnisses Detergengkonzentration/Proteinkonzentration allein.

Alle diese Vorgehensweisen erwiesen sich bei der GCAM-ATPase-Aktivität als nicht erfolgreich. Erst mit Hilfe des erstmals an der solubilisierten mitochondrialen F_0F_1 -ATPase (Pullman et al., 1960) und in der Folge bei anderen ATPasen (Bowman & Slayman, 1977; Bowman, 1983; Esmann & Skou, 1984; Surowy & Sussman, 1986) eingesetzten ATP-regenerierenden Systems war die Hydrolyse von ATP eine lineare Funktion von Extraktkonzentration und Inkubationszeit. Im ATP-regenerierenden System, das auch zur Bestimmung geringster K^+ -Konzentrationen verwendet werden kann (Outlaw et al., 1979), katalysiert die Mg^{2+} - und K^+ -abhängige Pyruvat-Kinase (PK) die Reaktion von ADP und Phosphoenolpyruvat (PEP) zu ATP und Pyruvat:



Wie in Abb. 4 beispielhaft dargestellt, verläuft die Hydrolyse von ATP linear, offensichtlich weil das in der ATPase-Reaktion gebildete ADP über PEP und PK zu ATP "regeneriert" wird, und damit die Konzentration von ADP im Testansatz niedrig gehalten wird. Fehlen PEP und PK, so hemmen bereits weniger als 50 μM ADP die ATPase-Reaktion deutlich. Das ATP-regenerierende System wurde damit fester Bestandteil der Standardansätze zur Bestimmung der ATPase-Aktivität des gelösten Enzyms.

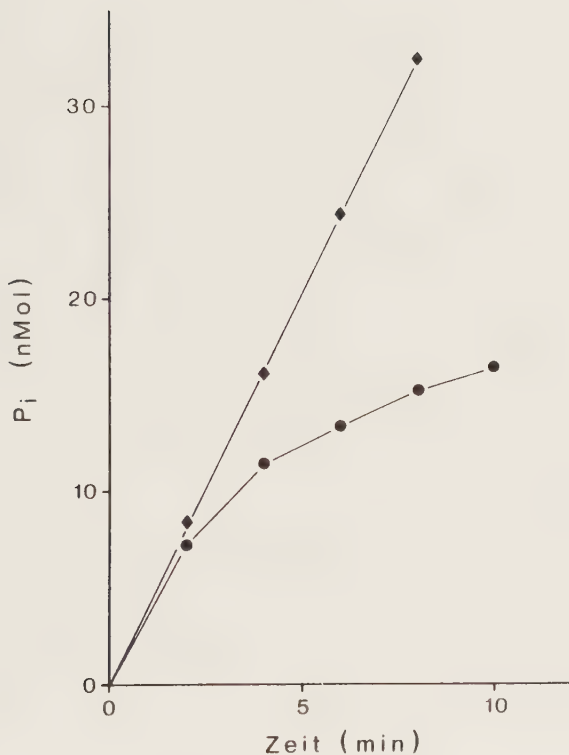


Abb. 4 : GCAM-ATPase-Aktivitäten mit (◆) und ohne (●) ATP-regenerierendes System.

Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und Na_3VO_4 . Dargestellt sind die Werte eines Versuchs. Insgesamt wurden drei Versuche mit je verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt.

3.2.5 Azid- und Vanadat-sensitive ATPase-Aktivitäten

Das Ausgangsmaterial der Experimente zur Solubilisierung, die mit GCAM angereicherte Membranfraktion, enthält als Kontamination mitochondriale ATPase-Aktivität, die durch Azid hemmbar ist, und Phosphatase-Aktivität, die mit Vanadat unterdrückt werden kann. Daher wurde nun untersucht, in welchem Maße die solubilisierten und die unlöslichen, nach der Zentrifugation im Pellet verbliebenen ATPase-Aktivitäten Azid- und Vanadat-hemmbar Anteile aufweisen (Tab. 9). Die relativen Anteile der verschiedenen ATPase-Aktivitäten im solubilisierten Überstand verhalten sich unterschiedlich zu denjenigen in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion. Mehr als 90% reagieren unempfindlich gegenüber Azid und Vanadat. Im unlöslichen Membranmaterial des Pellets hingegen läßt sich der allergrößte Teil der ATPase-Aktivität (75%) durch Azid hemmen, ist also mitochondrialen Ursprungs.

Tab. 9: Azid- und Vanadat-sensitive ATPase-Aktivitäten in Überstand und Pellet.

Standardansätze mit/ohne 0.5 mM NaN_3 , mit/ohne 0.1 mM Na_3VO_4 . Spezifische Aktivitäten in $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.) aus fünf voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Hemmstoff	spez. Aktivitäten	
	Überstand	Pellet
-	169 $\pm$ 24	106 $\pm$ 25
0.5 mM NaN_3	159 $\pm$ 18	30 $\pm$ 20
0.5 mM NaN_3 / 0.1 mM Na_3VO_4	156 $\pm$ 15	29 $\pm$ 20

3.2.6 Mikrogelelektrophorese solubilisierter Proteine

Der solubilisierter Überstand wurde in nativen Mikrogradientengelen auf Proteinbanden, ATPase-Aktivität und Sensitivität gegen NEM analysiert (Abb. 5). Die relativen molekularen Massen der solubilisierter Proteine wurden über den Vergleich mit Standardproteinen abgeschätzt (A). Die Proteinfärbung mit Coomassie Blue (B) zeigt Proteinbanden im Bereich von ca. 40 K bis ca. 900 K relativer molekularer Masse (M_r). Mindestens vier der Proteinbanden reagieren auf ATPase-Färbung im Gel (C). Wird die ATPase-Färbung in Anwesenheit von NEM, dem Hemmstoff der membrangebundenen GCAM-ATPase durchgeführt, werden zwei hochmolekulare Proteinbanden mit ca. 600 K und ca. 900 K nicht angefärbt (D). Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß diese beiden hochmolekularen Proteinbanden die GCAM-ATPase darstellen und sie möglicherweise in Form zweier verschiedener Oligomere vorliegt. Die Wirkung von NEM auf die solubilisierter ATPase konnte nur im Gel nachgewiesen werden, da im enzymatischen Test die notwendige Abwesenheit von β -Mercaptoethanol zum Verlust meßbarer Enzymaktivität führt.

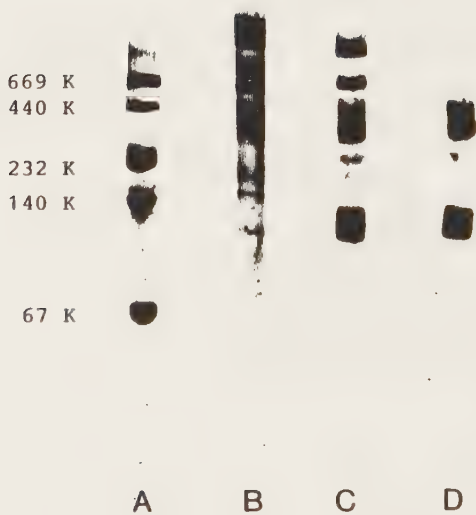


Abb. 5: Native μ PAGE solubilisierter Proteine.

Eichproteine (A), Proteinfärbung (B), ATPase-Färbung (C) und ATPase-Färbung in Anwesenheit von NEM (D).

3.3 Reinigung der GCAM-ATPase

Nach der Solubilisierung der GCAM-ATPase-Aktivität sollte als nächstes der Überstand von Fremdproteinen gereinigt werden. Daß dies nicht in einem einzigen Schritt durchzuführen sein würde, war aufgrund der vielen Proteinbanden im nativen Mikrogel (siehe Abb. 5) wahrscheinlich. In Vorversuchen zeigte sich, daß $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, FPLC mit Mono Q und Affinitätschromatographie (ATP-Agarose) die Proteine des solubilisierten Überstands nicht zufriedenstellend trennen konnten. Aus diesem Grund habe ich mich entschieden, als ersten Trennungsschritt die Zentrifugation im Dichtegradienten zu nutzen.

3.3.1 Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten

Wird der solubilisierter Überstand im Saccharose-Dichtegradienten in der im Abschnitt 2.5. angegebenen Weise zentrifugiert und fraktioniert, findet man die aufgetragene Proteinmenge gleichmäßig über die Fraktionen von 30 - 0% Saccharose verteilt (Fraktions-Nummern 3-6, Abb. 6). Die Fraktionen mit 50% und 40% Saccharose (Fraktions-Nummern 1 und 2) enthalten kein Protein. Die GCAM-ATPase-Aktivität erscheint zu mehr als 90% in der 30%-Saccharosefraktion, wird also vom allergrößten Teil des kontaminierenden Proteins abgetrennt. Die GCAM-ATPase wird jedoch teilweise inaktiviert, da der Proteingehalt der 30%-Fraktion um den Faktor 4 verglichen zur aufgetragenen Menge sinkt, die spezifische ATPase-Aktivität hingegen nicht mit demselben Faktor steigt (von ca. 140 auf ca. 220 $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ in der 30%-Saccharosefraktion).

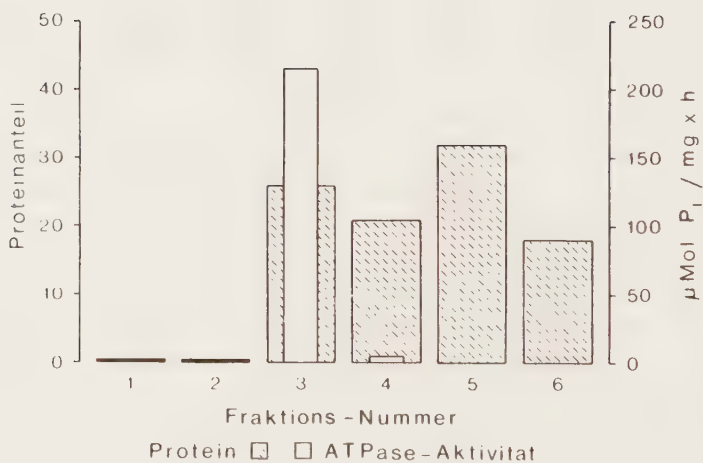


Abb. 6: Verteilung von solubilisierter Azid- und Vanadat-insensitiver ATPase-Aktivität und Proteinmenge nach der Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten.

Die spezifische ATPase-Aktivität in der 30%-Saccharosefraktion ist $216 \pm 40 \mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$, (Mittelwert $\pm$ S.D. aus 5 voneinander unabhängigen Versuchen, Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1 mM Na_3VO_4), der Proteingehalt 25% der aufgetragenen Menge.

Die solubilisierte ATPase-Aktivität im Überstand enthält, wenngleich nur in geringem Umfang, Azid- und Vanadat-hemmbar ATPase-Aktivitäten (vgl. Tabelle 9). Deshalb wurden auch in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten die Anteile Azid- und Vanadat-sensitiver ATPase-Aktivität bestimmt (Tab. 10).

Tab. 10: Verteilung von ATPase-Aktivitäten im Saccharose-Dichtegradienten.

Standardansätze mit und ohne 0.5 mM NaN_3 , sowie mit und ohne 0.1 mM Na_3VO_4 . Spezifischen Aktivitäten aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Membranpräparationen in $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.).

Hemmstoffe	Gradientenfraktion (% Saccharose)		
	30%	20%	10%
-	210 $\pm$ 30	17 $\pm$ 5	17 $\pm$ 6
0.5 mM NaN_3	208 $\pm$ 23	14 $\pm$ 3	13 $\pm$ 10
0.5 mM NaN_3 / 0.1 mM Na_3VO_4	223 $\pm$ 22	11 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2

Allein die ATPase-Aktivität der 30%-Saccharosefraktion ist insensitiv gegen die Hemmstoffe Azid und Vanadat. In der 20%-Fraktion hemmen Azid und Vanadat die ATPase-Aktivität jeweils um ca. 15 - 20%. Der größte Teil der Vanadat-sensitiven ATPase-Aktivität wird in der 10%-Fraktion wiedergefunden. Dies verdeutlicht die Tauglichkeit der Zentrifugation im Dichtegradienten für die Abtrennung der gesuchten GCAM-ATPase von den sie begleitenden Fremd-ATPase-Aktivitäten. Inwiefern die 30%-Saccharosefraktion noch Proteinanteile einschließt, die keine ATPase-Aktivität besitzen, konnte an dieser Stelle noch nicht entschieden werden.

3.3.2 Mikrogelelektrophorese der 30%-Saccharosefraktion

Die Proteine in der 30%-Saccharosefraktion wurden in nativen Mikrogradientengelen ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt und auf Proteinbanden, ATPase-Aktivität im Gel, sowie Glykoproteinfärbung hin analysiert (Abb. 7).

Im linken Gel (A) wurden Proteine mit Coomassie Blue gefärbt. Man erkennt zwei Proteinbanden mit relativen molekularen Massen (M_r) von ca. 600 und ca. 900 K (vgl. Abb. 5). In beiden hochmolekularen Proteinbanden findet man ATPase-Aktivität (B). Da zudem beide Banden auf Glykoproteinfärbung reagieren (C), stützt dies die Vermutung, daß in beiden Banden dieselbe molekulare Qualität in Form zweier verschiedener Oligomere vorliegt.



Abb. 7: Native μ PAGE der 30%-Saccharosefraktion aus der Dichtegradienten-Zentrifugation.

Proteinfärbung (A), ATPase-Färbung im Gel (B) und Glykoproteinfärbung (C).

3.3.3 FPLC mit Anionenaustauscher

Die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation trennt die GCAM-ATPase-Aktivität als Hauptbestandteil vom Rest des solubilisierten Proteins und restlichen Fremd-ATPase-Aktivitäten. Wie aus der nativen Mikrogelelektrophorese hervorgeht, liegt die ATPase-Aktivität möglicherweise in Form zweier verschiedener Oligomere vor.

Mittels FPLC mit dem Anionenaustauscher Mono Q, sollte versucht werden, die beiden ATPase-Aktivitäten voneinander zu trennen. Abb. 8 zeigt das Elutionsprofil eines von 0 bis 1 M linear ansteigenden NaCl-Gradienten. Man findet nur eine einzige FPLC-Fraktion, die Protein und ATPase-Aktivität enthält. Sie wird mit ca. 280 mM NaCl eluiert. Der "Start-Peak" zwischen 0 und 2 min Elutionsdauer und 0 mM NaCl, von dem ich in den ersten Experimenten annahm, er enthielte netto positiv geladene Proteine, die nicht an den Anionenaustauscher binden, enthält kein Protein (Proteinbestimmung mit der Amidoschwarz-Methode). Die beiden kleineren Spitzen im Elutionsprofil, die vor der die ATPase enthaltenden Fraktion zu sehen sind, stellen Verunreinigungen im Tris des Elutionspuffers dar, wie in Kontrollexperimenten festgestellt wurde.

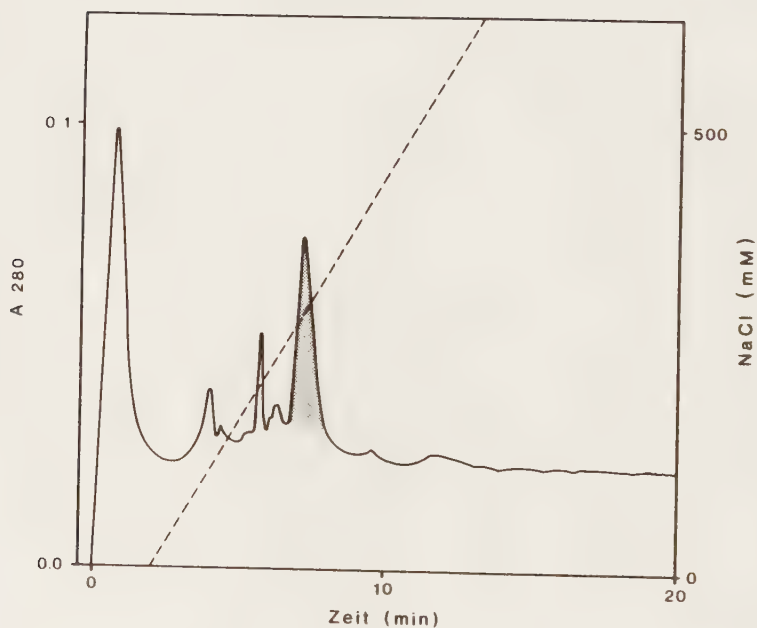


Abb. 8: FPLC mit Mono Q Anionenaustauscher. Die Säule wurde mit 0.5 ml der die Azid- und Vanadat-insensitive ATPase-Aktivität enthaltenden 30%-Saccharosefraktion des Dichtegradienten beladen. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die gepunktete Fläche bedeutet aktive ATPase-Fraktion. Insgesamt wurden sieben FPLC-Läufe durchgeführt.

Die native Mikrogelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung der FPLC-Fraktion mit ATPase-Aktivität läßt keine Unterschiede zum Bandenmuster aus der 30%-Saccharosefraktion des Dichtegradienten erkennen (Abb. 10). Man erhält wiederum zwei hochmolekulare Proteinbanden. Wird der NaCl-Gradient während der Elution bei 280 mM auf einem Plateau gehalten, oder fraktioniert man den ATPase-Peak in seine aufsteigende Phase, in die Spitze und in seine abfallende Phase, so erhält man dieselben Resultate (nicht dargestellt).

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS und nachfolgender Coomassie-Färbung macht deutlich, daß das Muster der Proteinbanden der 30%-Saccharosefraktion des Dichtegradienten mit dem der FPLC-Fraktion identisch ist (Abb. 9), mit FPLC also keine höhere Reinigung der ATPase zu erzielen ist. Die Bahnen B und C (30%-Saccharosefraktion) und die Bahn D (FPLC-Fraktion) zeigen 5 Hauptproteinbanden mit relativen molekularen Massen von 70, 57, 46, 29 und 17 K.

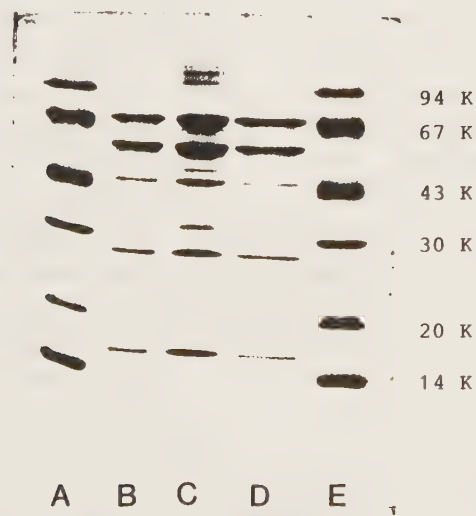


Abb. 9: SDS-PAGE der 30%-Saccharosefraktion (B, 4 μ g Protein und C, 8 μ g Protein) und der FPLC-Fraktion (D, 5 μ g Protein). Markerproteine in A und E.



Abb. 10: Native μ PAGE der GCAM-ATPase nach FPLC (A), und zweiter Dichtegradienten-Zentrifugation: 80%- (B), 70%- (C) und 60%-Saccharosefraktion (D).

3.3.4 Zusätzliche Dichtegradienten-Zentrifugation

Die 30%-Saccharosefraktion (1 ml) des Dichtegradienten wurde auf einen zweiten Saccharose-Dichtegradienten (80-40%, 10%-Stufen) geladen. Zentrifugiert man 8h bei 50 000 Upm im TV 865 Vertikal-Rotor und fraktioniert den Gradienten (1ml-Fractionen), findet man in den 60-80%-Saccharosefraktionen Azid- und Vanadat-insensitive ATPase-Aktivitäten. Die ATPase erscheint in nativen Mikrogelen wiederum als Doppelbande (Abb. 10).

3.3.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Wie in den letzten Abschnitten gezeigt, kann die solubili-sierte GCAM-ATPase-Aktivität mit Hilfe der Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten gereinigt werden. FPLC mit An- ionenaustauscher sowie die Zentrifugation durch einen zweiten Dichtegradienten führen zu keinem höherem Reinheitsgrad der ATPase aus der 30%-Saccharosefraktion. Endgültige Auskunft darüber, ob die beiden hochmolekularen Proteinbanden in den nativen Mikrogelen Aggregate unterschiedlicher Anzahl, also Oligomere desselben ATPase-Moleküls darstellen, sollte über die Elution der beiden hochmolekularen Proteinbanden aus Polyacrylamid-Gradientengelen nach nativer PAGE in Minigelen gewonnen werden.

Die 30%-Saccharosefraktion wurde in einem von 3 bis 10% linear ansteigenden nativen Polyacrylamidgradientengel elektrophoretisiert. Schneidet man danach zur Identifizierung der Position der Proteine im Gel zwei schmale Streifen an den Rändern und einen aus der Mitte des Gels aus und färbt sie mit Coomassie Blue, so findet man in massiv überladenen Gelen die aus den Mikrogelelektrophoresen bekannten Protein- banden (Abb. 11, A). Aus dem ungefärbten Gel wurden die beiden Banden voneinander getrennt ausgeschnitten und die Proteine eluiert. Nach SDS-PAGE der eluierten Proteinbanden erkennt man für beide nahezu identische Polypeptidzusammen-

setzung. Geringe Unterschiede existieren bezüglich der 46 K-Bande. Sie scheint in der Proteinbande 1 etwas stärker als in der Proteinbande 2 vertreten zu sein.

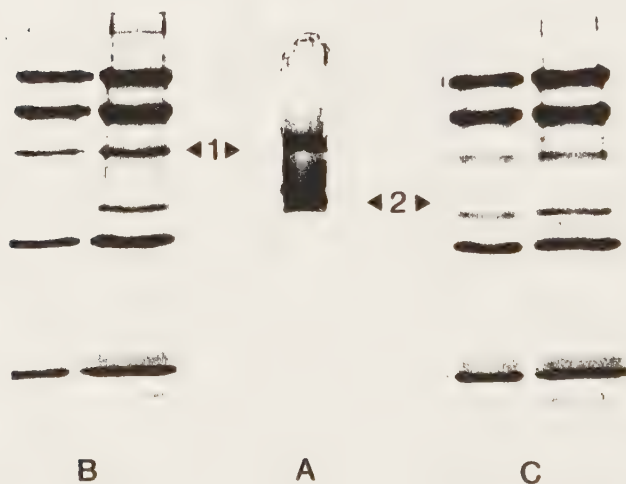


Abb. 11: Native PAGE der 30%-Saccharosefraktion (A) und SDS-PAGE der beiden aus dem Gradientengel eluierten hochmolekularen Proteinbanden (B und C, jeweils 2,5 und 5 μg Protein).

3.3.6 Zusammenfassende Darstellung der Reinigung der GCAM-ATPase

Die solubilisierete GCAM-ATPase aus dem Mitteldarmepithel von Manduca sexta konnte mit Hilfe der Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten in einem einzigen Schritt gereinigt werden. Versuche, die beiden hochmolekularen Proteinbanden, beide mit ATPase-Aktivität, mit Hilfe von Ionenaustauscherchromatographie oder durch Zentrifugation in einem zweiten Dichtegradienten aufzutrennen, waren nicht erfolgreich. Erst nach Elution der beiden Proteine aus nativen Polyacrylamidgelen und anschließender Analyse mittels SDS-PAGE durfte man annehmen, daß sie oligomere Zustände der GCAM-ATPase darstellen. Tab. 11 faßt die Daten der Reinigungsschritte der GCAM-ATPase zusammen. Die in Tabelle 11 dargestellten Mittelwerte wurden aus den in Tabelle 12 dargestellten individuellen Meßpunkten der vier Fraktionen (Membranfraktion, Überstand und Pellet, 30%-Saccharosefraktion) gebildet. Die individuellen Meßpunkte werden gesondert dargestellt, da nur in insgesamt drei Experimenten sämtliche Meßpunkte aus allen Fraktionen ermittelt wurden. Jeder beliebig gewählte Meßpunkt aus einer Kolonne in Tabelle 12 ist - mit Ausnahme der Gesamtproteinmenge - vergleichbar mit jedem anderen Meßpunkt derselben Kolonne und mit jedem beliebigen Meßpunkt derselben Kolonne einer anderen Fraktion. Da dies auch unter der Voraussetzung durchaus sehr unterschiedlicher Mengen an Ausgangsmaterial (Faktor 10) zutrifft, halte ich die vergleichende Zusammenfassung der Meßpunkte verschiedener Fraktionen aus verschiedenen Experimenten für legitim.

Tab. 11: Zusammenfassung der Daten zur Reinigung der GCAM-ATPase.

Spezifische Aktivitäten in $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$, Gesamtaktivitäten in $\mu\text{Mol/Larve} \times \text{h}$ (Mittelwerte $\pm$ S.D.). Die ATPase-Aktivitäten wurden in Standardansätzen mit 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 bestimmt.

Qualität der zusammengefaßten Meßpunkte (Anzahl der voneinander unabhängigen Versuche mit je verschiedenen Präparationen in Klammern):

- Membranfraktion: spezifische Aktivität und Gesamtaktivität (17), Proteingehalt (27)
- Überstand: spezifische Aktivität und Gesamtaktivität (13), Proteingehalt (17).
- Pellet: spezifische Aktivität und Gesamtaktivität (12), Proteingehalt (17).
- 30%-Saccharosefraktion: spezifische Aktivität (14), Gesamtaktivität (14), Proteingehalt (14).

	Protein- gehalt (%)	spez. Aktivität	Gesamt- aktivität
GCAM anger. Mebranfr.	100	28 ± 6	0.6 ± 0.3
100 000 xg- Überstand	69 ± 4	142 ± 29	2.5 ± 0.9
Pellet	31 ± 4	27 ± 13	0.2 ± 0.1
30%-Sacch.- Fraktion	14 ± 4	219 ± 39	1.0 ± 0.5

Tab. 12: Darstellung sämtlicher individueller Meßpunkte der Fraktionen zur Reinigung der GCAM-ATPase (Membranfraktion, Überstand und Pellet, 30%-Saccharose-Fraktion).
Gesamtproteingehalt (Ges:Prot.) in μg , spezifische Aktivität (spez. Akt.) in $\mu\text{mol}/\text{mg} \times \text{h}$, Gesamtaktivität (Ges.-Akt.) in $\mu\text{mol}/\text{Larve} \times \text{h}$.

Versuch Nr.	Larven	Membranfraktion			Pellet			Überstand			30%-Sacch.-Fraktion		
		Ges.-Prot.	spez. Akt.	Ges.-Akt.	Prot. (%)	spez. Akt.	Ges.-Akt.	Prot. (%)	spez. Akt.	Ges.-Akt.	Prot. (%)	spez. Akt.	Ges.-Akt.
1	10	224	22.5	0.50									
2	10	112	28.5	0.32									
3	10	155	26.8	0.41									
4	10	331	32.2	1.01									
5	7	83	40.0	0.48									
6	9	122	29.3	0.40									
7	9	169	25.0	0.54									
8	5	88	25.9	0.45									
9	22	720	18.4	0.60	30	40.2	0.31	70	136.2	2.67			
10	10	280	29.7	0.83	27	25.3	0.17	73	148.7	3.96			
11	10	336	23.3	0.78	28	12.7	0.12	72	143.9	4.02			
12	12	288	20.1	0.48	36	12.4	0.14	64	180.1	1.90			
13	11	222	24.1	0.47	26	13.1	0.07	74	149.1	1.40			
14	8	207			27	29.3	0.15	73	134.4	2.04			
15	11	181			32	30.8	0.20	68	148.4	2.08			
16	11	514	29.5	1.37	32	28.5	0.36	68	130.9	3.86	16	247.8	1.93
17	31	684	30.6	0.68	31	21.0	0.14	69	113.6	1.96	18	182.4	0.77
18	32	663	42.6	0.88	29	22.8	0.19	71	88.4	1.65	14	121.5	0.92
19	38	1080			38	28.1	0.37	62	111.9	2.32	9	239.9	0.59
20	32	711			32	60.5	0.53	68	159.0	2.43	19	203.4	0.89
21	59	1112	33.8	0.64				71	203.7	2.74	20	247.7	0.96
22	31	1191			29						7	220.5	0.48
23	18	504									10	225.8	0.62
24	10	311			31			69			19	232.4	2.09
25	33	567			39			61			16	273.6	1.0
26	20	307			30			70			11	197.3	0.40
27	11	320			32			68			14	238.3	1.40

3.4 Eigenschaften der gereinigten GCAM-ATPase

Die in der 30%-Saccharosefraktion nach Dichtegradienten-Zentrifugation wiedergefundene solubilisierete ATPase-Aktivität wird im folgenden als gereinigte GCAM-ATPase bezeichnet. Sie wurde charakterisiert, um zu prüfen, ob sich wesentliche Eigenschaften des Enzyms während der Aufreinigung verändern. Der Vergleich mit den Eigenschaften der membrangebundenen ATPase sollte sicherstellen, daß das "richtige" Protein isoliert wurde.

Die in den voranstehenden Abschnitten beschriebenen Aktivitäten der solubilisierten und gereinigten GCAM-ATPase wurden mit Hilfe des ATP-regenerierenden Systems bestimmt, um Linearität der Hydrolyserate von ATP in der Zeit zu erzielen. Zur Charakterisierung der KCl-Abhängigkeit, der Substratspezifität, der Inhibitor-Sensitivität und der Salz-Selektivität der gereinigten ATPase wurde dieses System nicht eingesetzt, weil die Pyruvat-Kinase (PK) als sein wesentlicher Bestandteil die Anwesenheit von K^+ -Ionen und ADP (neben PEP) als Substrat benötigt. Wie Abb. 4 zeigt, ändern sich die Eigenschaften des Enzyms, wenn PEP und PK im Inkubationsansatz fehlen: Die ATP-Hydrolyse verläuft bereits nach 2 min nicht mehr linear in der Zeit, die Phosphatproduktion scheint nach 1 min Inkubationszeit durch KCl um den Faktor 2, nach 10 min Inkubationszeit um den Faktor 4 aktiviert zu sein (Abb. 12). Aus Abb. 12 geht jedoch auch hervor, daß die Produktion von P_i proportional zur eingesetzten Proteinmenge verläuft. Da an dieser Stelle nicht die Bestimmung der absoluten Aktivität der ATPase, sondern der relativen Wirksamkeiten der getesteten Komponenten beabsichtigt war, wurden die ATPase-Aktivitäten nach zwei verschiedenen langen Inkubationszeiten bestimmt. Die relative Wirksamkeit der getesteten Komponenten auf die ATPase-Aktivitäten war bei beiden Inkubationszeiten dieselbe und wurde deshalb als wahr genommen. Mit Ausnahme der Bestimmung der Substratspezifität wurde die Konzentration von Tris in den Versuchsansätzen vermindert, da Tris selbst als Kation die Aktivität der GCAM-ATPase modifi-

ziert (vgl. Tab. 15). Die scheinbaren "spezifischen Aktivitäten" der gereinigten GCAM-ATPase unter den angegebenen Bedingungen reichten von 10 - 35 $\mu\text{Mol/mg} \times \text{h}$. Die ATP-Kennlinie der ATPase konnte mit dem ATP-regenerierenden System bestimmt werden. Die spezifische Aktivität dort erreicht die bekannt hohen Werte.

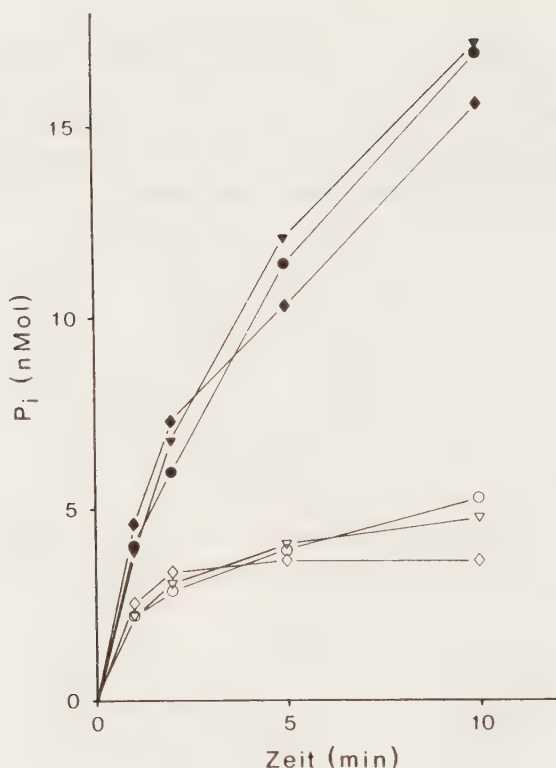


Abb. 12: Aktivität der gereinigten GCAM-ATPase als Funktion der Zeit in Inkubationsansätzen ohne ATP-regenerierendes System.

Standardansätze mit 0.5 mM NaN_3 und 0.1 mM Na_3VO_4 , mit (geschlossene Symbole), und ohne 20 mM KCl (offene Symbole). Aufgetragen ist der Zeitverlauf der P_i -Produktion in Abhängigkeit verschiedener Proteinmengen: 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (▽), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (○) und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (◇). Die P_i -Werte der Ansätze mit 20 und 40 μg Protein wurden auf diejenigen mit 13 μg bezogen und um den jeweiligen Verdünnungsfaktor korrigiert. Dargestellt sind die Werte aus einem Versuch. Insgesamt wurden drei Versuche mit je verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt.

3.4.1 KCl-Abhängigkeit

Die gereinigte GCAM-ATPase ist wie die membrangebundene in ihrer Aktivität von der KCl-Konzentration abhängig (Abb. 13). Die ATPase-Aktivität wird mit 10 mM KCl halbmaximal aktiviert, erreicht ihr Optimum mit 50 mM und fällt mit steigender KCl-Konzentration. 150 mM KCl aktivieren die Enzymaktivität noch um den Faktor 2 verglichen mit derjenigen ohne KCl. Die KCl-Abhängigkeit der ATPase ist notwendig an die Anwesenheit von MgCl_2 gebunden. Fehlt es, ist die ATPase bei allen KCl-Konzentrationen inaktiv.

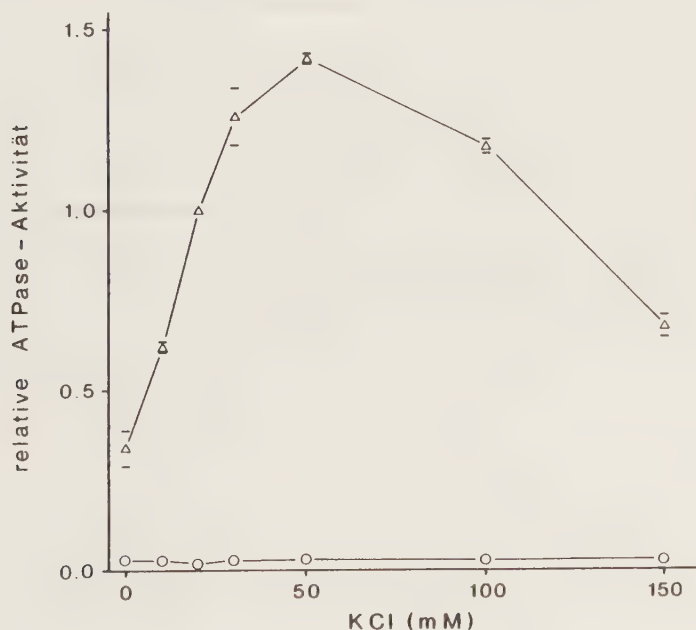


Abb. 13: KCl-Abhängigkeit der gereinigten GCAM-ATPase. Testansätze mit 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM Tris-ATP, 0.1 mM EDTA, 3 mM Mercaptoethanol, 5 mM Tris und verschiedenen KCl-Konzentrationen. Drei voneinander unabhängige Versuche mit je verschiedenen Membranpräparationen (Mittelwerte $\pm$ S.D.) mit MgCl_2 (Δ), einer ohne MgCl_2 (O).

3.4.2 Substrat-Spezifität

Von den getesteten Substanzen (Tab. 13) erwiesen sich nur die Trinukleotide ATP, GTP, UTP und CTP als Substrate der gereinigten GCAM-ATPase. Die Purinnukleotide ATP und GTP werden bevorzugt und mit derselben Rate hydrolysiert, während die Pyrimidinnukleotide UTP und CTP unterschiedlich wirken. UTP erreicht noch mehr als 35% der Wirksamkeit von ATP, CTP nur etwa 10%. Da auch ADP, AMP und NPP keine Substrate der GCAM-ATPase sind, bedeutet dies, daß das Enzym keine Phosphatase-Aktivität besitzt. Die gereinigte ATPase ist somit in ihrer Substrat-Spezifität identisch mit der membrangebundenen.

Tab. 13: Substrat-Spezifität der gereinigten GCAM-ATPase. Testansätze mit 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 3 mM Mercaptoethanol, 20 mM KCl, 55 mM Tris/MOPS. Die hohe Salzkonzentration wurde gewählt, um deren unspezifische Wirkung auf die ATPase bei allen Substraten gleich zu halten. Die Substratkonzentration betrug 1 mM. Drei voneinander unabhängige Versuche mit je verschiedenen Membranpräparationen (Mittelwerte $\pm$ S.D.).

Substrate	relative Aktivitäten
ATP	100
GTP	99 $\pm$ 10
UTP	35 $\pm$ 3
CTP	8 $\pm$ 1
ADP	2 $\pm$ 1
AMP	1 $\pm$ 0.5
NPP	2 $\pm$ 1

3.4.3 Inhibitor-Sensitivität

Azid in einer Konzentration von 0.5 und 1 mM, sowie 0.1 mM Vanadat haben keine Wirkung auf die Aktivität der ATPase (vgl. Tabelle 10).

Oligomycin ist kein Hemmstoff der gereinigten GCAM-ATPase (Tab. 14). Ihre Aktivität verhält sich unter dem Einfluß von Oligomycin identisch zu derjenigen der beiden anderen untersuchten Formen, der ATPase aus der mit GCAM angereicherten Membranfraktion (vgl. Tabelle 4), und derjenigen in gereinigten GCAM (Wieczorek et al., 1986).

Das hydrophobe Carbodiimid DCCD ist ein Hemmstoff der gereinigten GCAM-ATPase (Tab. 14). Bei einer Konzentration von 150 μ M fällt die ATPase-Aktivität auf ca. 5% des Kontrollwerts. Die Werte sind mit denen für die Membranfraktionen (vgl. Tabelle 4 und Wieczorek et al., 1986) vergleichbar. Unterschiede zwischen gereinigter und membrangebundener ATPase existieren bezüglich der 100-fach geringeren Konzentration von DCCD. Während 1.5 μ M die membrangebundene GCAM-ATPase-Aktivität nicht beeinflussen, hemmen sie die gereinigte ATPase um 80%.

Tab. 14: Inhibitor-Sensitivität der gereinigten GCAM-ATPase. Testansätze mit 20 mM KCl enthalten DCCD und Oligomycin (in abs. Ethanol) 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 3 mM Mercaptoethanol, 1 mM Tris-ATP, 5 mM Tris-HCl. Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Hemmstoff	relative Aktivitäten
-	100
Oligomycin (20 $\mu\text{g/ml}$)	83 $\pm$ 10
1.5 μM DCCD	19 $\pm$ 6
150 μM DCCD	5 $\pm$ 1

3.4.4 Salz-Selektivität

Erwiesen sich membrangebundene und gereinigte GCAM-ATPase in den bisher geschilderten Eigenschaften als nahezu identisch, so ergeben sich hinsichtlich der Salz-Selektivität größere Unterschiede. Da die gereinigte ATPase überraschenderweise durch Tris erheblich aktiviert wird (Tab. 15), mußte in den Inkubationsansätzen die Tris-Konzentration möglichst gering gehalten werden, um die relative Wirksamkeit der getesteten Kationen und Anionen bestimmen zu können. Aus diesem Grund sind in Tab. 15 neben den Werten für die gereinigte ATPase auch die der unter den geänderten Bedingungen gemessenen membrangebundenen ATPase-Aktivitäten aufgeführt.

1) Membrangebundene ATPase

Für die membrangebundene ATPase gelten im wesentlichen die Befunde aus dem Abschnitt 3.1.5. Die ins Sortiment der getesteten Salze hinzugenommenen Kationen Tris und Cholin, für die ein Transport über die Membran unwahrscheinlich ist, aktivieren um den Faktor 1.5 (Tris) bzw. verändern die Mg^{2+} -abhängige Enzymaktivität nicht (Cholin). Für die membrangebundene ATPase gilt auch bei verminderter Tris-Konzentration in den Testansätzen, daß die Wirkung der Kationen die der Anionen überwiegt.

2) Gereinigte ATPase

Für die gereinigte GCAM-ATPase lassen sich Kationen und Anionen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit nicht mehr eindeutig unterscheiden. Sowohl Kationen - in anderen Relationen als für die membrangebundene ATPase - als auch Anionen beeinflussen die Enzymaktivität.

a) Die Wirkung der Kationen

Tris ist das effektivste Kation. Es erhöht die Mg^{2+} -abhängige ATPase-Aktivität um den Faktor 5 und ist damit um 50% wirksamer als K^+ . NH_4^+ ist ebenfalls ein stärkerer Aktivator als K^+ . Li^+ übertrifft in seiner Wirksamkeit Na^+ , das verglichen mit seiner Wirkung am membrangebundenen Enzym "aufgeholt" hat und K^+ und Rb^+ gleichrangig geworden ist. Cholin als Kation ist fast unwirksam.

b) Die Wirkung der Anionen

Hält man K^+ als Kation konstant und variiert die Anionen, entfaltet F^- an der gereinigten ATPase eine noch stärker aktivierende Wirkung als an der membrangebundenen. Es erhöht die Aktivität verglichen mit Cl^- um den Faktor 1.5. Auch HCO_3^- aktiviert die ATPase, Br^- verhält sich wie Cl^- . NO_3^- ist wie schon für die membrangebundene ATPase auch ein Hemmstoff der gereinigten GCAM-ATPase.

Tab. 15: Salz-Selektivität der membrangebundenen und der gereinigten GCAM-ATPase in Tris-reduzierten Testansätzen. Jedes Salz wurde in einer Konzentration von 30 mM eingesetzt. Testansätze mit 0.5 mM NaN_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 0.1 mM EDTA, 3 mM Mercaptoethanol, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Tris-ATP, 5 mM Tris-HCl. Mittelwert ($\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

Salz	relative Aktivitäten	
	membrangebundene ATPase	gereinigte ATPase
-	39 $\pm$ 3	31 $\pm$ 6
KCl	100	100
RbCl	97 $\pm$ 7	102 $\pm$ 2
NH_4Cl	100 $\pm$ 4	135 $\pm$ 25
LiCl	71 $\pm$ 5	125 $\pm$ 15
NaCl	61 $\pm$ 1	108 $\pm$ 12
Tris-HCl	65 $\pm$ 4	153 $\pm$ 25
Cholin-Cl	44 $\pm$ 4	49 $\pm$ 12
KBr	100 $\pm$ 3	97 $\pm$ 27
KF	119 $\pm$ 6	150 $\pm$ 35
KHCO_3	109 $\pm$ 3	128 $\pm$ 10
KNO_3	40 $\pm$ 3	40 $\pm$ 11

3.4.5 ATP-Abhängigkeit

Nachdem die Wirkung von Tris auf die Aktivität der gereinigten ATPase, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, bekannt war, und das Substrat ATP in Form des Tris-Salzes verwendet wurde, wurde in den Experimenten zur Bestimmung der ATP-Abhängigkeit des Enzyms die Tris-Konzentration in den Versuchsansätzen konstant gehalten. Abb. 14 zeigt den Einfluß der ATP-Konzentration auf die ATP-Hydrolyse. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender ATP-Konzentration, ausgehend von 30 μM zu, und erreicht mit 3 mM ihr Maximum. 5 und 7 mM ATP verdeutlichen die Substratsättigung der gereinigten ATPase. Die Reaktion gehorcht einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik, die apparente K_M liegt zwischen 0.2 und 0.3 mM (vgl. Lineweaver-Burke-Plot, Inset Abb. 14).

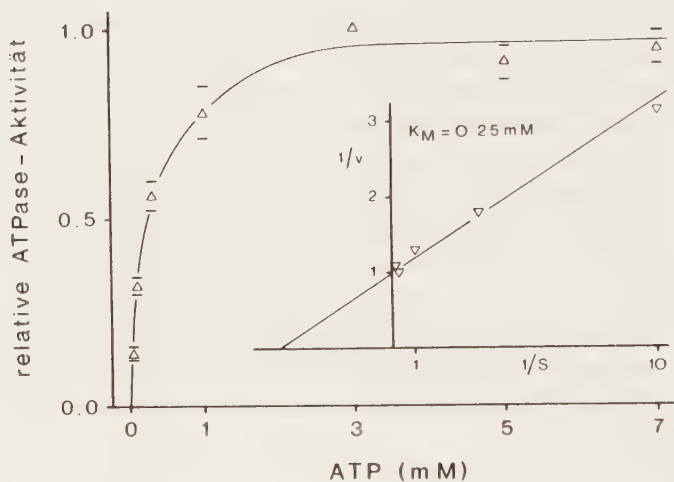


Abb. 14: ATP-Abhängigkeit der gereinigten GCAM-ATPase.

ATP-Konzentrationen von 0.03 - 7 mM ATP. Testansätze mit 0.5 mM Na_3N_3 , 0.1 mM Na_3VO_4 , 0.1 mM EDTA, 3 mM Mercaptoethanol, 20 mM KCl, 55 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM PEP, 3 U/ml PK.

Mittelwerte ($\pm$ S.D.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit je verschiedenen Membranpräparationen.

(Inset: Lineweaver-Burke-Plot)

4. DISKUSSION

4.1 Die mit GCAM angereicherte Membranfraktion

Cioffi und Wolfersberger (1983) ist es gelungen, aus dem posterioren Abschnitt des Mitteldarmepithels von Raupen des Tabakswärmers Manduca sexta Membranfraktionen reiner Apikalmembranen der Goblet- und Columnarzellen sowie Lateral- und Basalmembranen zu isolieren. Eine der Hauptschwierigkeiten in der Darstellung reiner GCAM war es, Kontamination durch Mitochondrien zu vermeiden. Dies führte zu aufwendigen Präparationsprozeduren, die einen erheblichen Verlust an Membranmaterial reiner GCAM zur Folge hatten. Die Ausbeute an reinen GCAM, von denen man wußte, daß sie die Komponenten des aktiven K^+ -Transports bergen (Dow et al., 1984), betrug ca. 4 μ g Protein/Larve (Wieczorek et al., 1986) und damit etwa 0.25% des Rohextrakts der Membranfraktionen des Mitteldarms. Die Proteinausbeute in reinen GCAM ist also extrem gering. Im Hinblick auf die angestrebte Solubilisierung und Reinigung der GCAM-ATPase-Aktivität stellt die in dieser Arbeit beschriebene vereinfachte Präparationsmethode der GCAM einen Kompromiß dar: die Membranfraktion enthält, verglichen mit reinen GCAM, eine etwa 8-fach höhere Proteinmenge mit einer immer noch relativ hohen spezifischen Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase-Aktivität - eine der hervorragenden Eigenschaften der ATPase reiner GCAM (Wieczorek et al., 1986) - mit dem Nachteil der Verunreinigung durch mitochondriale ATPase-Aktivität und Phosphatase-Aktivität (Tabellen 1 und 2). Daß die Gesamtaktivität um den Faktor 6, der Proteingehalt um den Faktor 8 in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion höher ist als in reinen GCAM, bedeutet:

- 1) Die Proteinverunreinigung der mit GCAM angereicherten Membranfraktion ist gering verglichen mit reinen GCAM.
- 2) Bei der Präparation reiner GCAM ist der Verlust an GCAM-Membranmaterial relativ hoch.

- 3) Die spezifische Azid- und Vanadat-insensitive ATPase-Aktivität in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion ist nur wenig niedriger als in der reinen GCAM.

Die GCAM-ATPase-Aktivität in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion zeigt dieselben Merkmale wie die ATPase-Aktivität in reinen GCAM: Die ATPase ist bei pH 8 mit 20-50 mM K^+ um den Faktor 2 verglichen mit der Mg^{+} -abhängigen Basalaktivität stimulierbar. Neben K^+ wird das membrangebundene Enzym durch andere einwertige Kationen aktiviert, die Variation der Anionen führt mit Ausnahme von NO_3^- , das die GCAM-ATPase hemmt, zu keinen deutlichen Effekten. Die Purinnukleotide ATP und GTP sind bevorzugte Substrate der ATPase, das Pyrimidinnukleotid UTP wird weit weniger genutzt, CTP ist gering wirksam, ADP und AMP sind keine Substrate.

Obwohl in der Plasmamembran lokalisiert, ist die hier beschriebene ATPase der GCAM nicht der Familie der bisher bekannten ATPasen aus Plasmamembranen (P-Typ) zuzuordnen. Die (Na^+-K^+) -ATPase wird durch Ouabain (Ruoho & Kyte, 1974) und geringe Konzentrationen von Vanadat gehemmt (Cantley et al., 1977; Cantley et al., 1978). Die von Sachs et al. (1976) beschriebene elektroneutrale H^+/K^+ -ATPase in der Plasmamembran der Magenschleimhaut, von der man glaubte, sie sei der GCAM-ATPase verwandt (Wallmark et al., 1980), wird zwar durch K^+ -Ionen stimuliert, nutzt aber im Unterschied zur GCAM-ATPase nur ATP als Substrat. Ihre Aktivität kann mit Vanadat und F^- gehemmt werden, sie ist insensitive gegen NO_3^- . Die mit einwertigen Kationen stimulierbare H^+ -ATPase in der Plasmamembran von Pflanzenzellen reagiert ebenfalls sehr sensitiv gegenüber Vanadat und bevorzugt ATP als Substrat (Gallagher & Leonhard, 1982; O'Neil & Spanswick, 1984). Auch die Protonen-ATPasen in der Plasmamembran der niederen Eukaryonten Neurospora und Schizosaccharaomyces werden durch Vanadat gehemmt (Bowman et al., 1978; Dufour et al., 1980).

Ihre Insensitivität gegenüber Oligomycin und geringen DCCD-Konzentrationen unterscheidet die GCAM-ATPase auch von der membrangebundenen mitochondrialen F_0F_1 -ATPase. Oligomycin und DCCD wirken auf die F_0 -Einheit (Kagawa & Racker, 1966; Bulow & Racker, 1968). Sie hemmen in mikromolaren Konzentrationen die Protonenleitfähigkeit (Pansini et al., 1978). DCCD bindet dabei an ein membranintegrales ca. 10 K-Proteolipid (Stekhoven et al., 1972; Cattel et al., 1971).

Ein sehr wirksamer Hemmstoff der GCAM-ATPase ist das SH-Gruppen-Reagens N-Ethylmaleimid (NEM). Bereits weniger als 1 μ M NEM bewirken mehr als 50% Hemmung der Enzym-Aktivität. Die membrangebundene GCAM-ATPase gleicht dadurch den H^+ -Pumpen in sauren intrazellulären Organellen (V-Typ). Sie wurden in Endosomen (Galloway et al., 1983), Lysosomen (Harikumar & Reeves, 1983; Dell'Antone, 1984) und dem Golgi-Komplex (Glickman et al., 1983) nachgewiesen. Man fand sie darüber hinaus in den Organellen mit sekretorischer Funktion, in chromaffinen Granula (Apps et al., 1980; Cidon & Nelson, 1983), cholinergen synaptischen Vesikeln (Anderson et al., 1981; Toll & Howard, 1980), neurosekretorischen Vesikeln (Russel, 1984) und "clathrin coated vesikels" (Forgac et al., 1983; Stone et al., 1983; Van Dyke et al., 1984). Die Funktion dieser Protonenpumpen besteht in der Ansäuerung des internen Milieus der Organellen.

In chromaffinen Granula sinkt der durch die H^+ -ATPase getriebene Protonenfluß in Gegenwart von 10 μ M NEM auf fast die Hälfte (Flatmark et al., 1982). Stone et al. (1983) und van Dyke et al. (1984) gelang es, in "clathrin-coated vesicles" aus Rattenleber die H^+ -Translokation mit 100 μ M NEM zu unterdrücken, die keinen Einfluß auf diejenige in submitochondrialen Partikeln aus demselben Organsystem haben. Für die Hemmung der lysosomalen Protonenpumpe genügen 100 μ M NEM (Harikumar & Reeves, 1983). Die Ansäuerung von Endosomen (Galloway et al., 1983), sowie die ATP-getriebene Serotoninaufnahme durch "platelet dense granule" (Dean et al., 1984) wird ebenfalls nicht durch Hemmstoffe der mitochon-

drialen ATPase und der (Na^+ - K^+)-ATPase verhindert, jedoch durch geringe NEM-Konzentrationen. Darüberhinaus ist NEM auch ein Hemmstoff von Protonen-Transport (Mandala & Taiz, 1985a) und H^+ -ATPase-Aktivität (Wang & Sze, 1985) in Tonoplasten von Pflanzenzellen.

Hinweise auf die Verwandtschaft der GCAM-ATPase mit dem Protonen-pumpenden Vakuolen-Typ von ATPasen haben Wieczorek et al. (1986) bereits diskutiert. Durch den Einfluß von NEM auf die Azid- und Vanadat-insensitive ATPase-Aktivität in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion wurde dieser im wesentlichen auf die Unwirksamkeit von Hemmstoffen des F- und P-Typs von ATPasen - Azid, Olygomycin, DCCD in mikromolarer Konzentration, Vanadat - sowie der Hemmung durch Nitrat, einem Hemmstoff der V-Typ-ATPasen (Bowman, 1983; Mandala & Taiz, 1985a; O'Neil et al., 1983; Walker & Leigh, 1981, Cidon & Nelson, 1983) gestützten Vermutung ein weiteres überzeugendes Argument hinzugefügt. Daß in der Tat die durch einwertige Kationen stimulierbare ATPase in der mit GCAM angereicherten Membranfraktion aktiv Protonen transloziert, beweisen neueste Ergebnisse aus unserem Labor (Weerth, 1988). In der mit GCAM angereicherten Membranfraktion konnte ein Azid- und Vanadat-insensitiver, indessen NEM-sensitiver, ATP und GTP-abhängiger elektrogener H^+ -Transport nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Kalium bricht ein bereits bestehender pH-Gradient zusammen, bzw. kann nicht ausgebildet werden. Kalium ist also die Ursache eines gestiegenen Netto-Protonenflusses aus den Membranvesikeln. Da Kalium zwar den pH-Gradienten, nicht jedoch das ATP-abhängige Membranpotential beeinflusst, erfolgt der Protonenstrom elektroneutral. Für den aktiven elektrogenen Kaliumtransport über die apikale Gobletzellmembran wird die Vorstellung des Zusammenwirkens einer Protonenpumpe mit einem H^+/K^+ -Antiporter favorisiert (Abb. 15): Der primäre aktive Schritt könnte ein elektrogener Protonentransport sein, der sekundär einen elektroneutralen Kalium/Protonen-Austausch treibt. Der Kaliumflux sollte zusätzlich durch eine ebenfalls nachgewiesene Anionenleitfähigkeit unterstützt

werden.

Folgende Überlegungen stützen diese Vorstellung:

- 1) Hinweis für einen H^+/K^+ -Antiporter in der Gobletzellmembran sind die gleiche Kationen-Selektivität und die gleiche Kalium-Empfindlichkeit von Protonentransport und membrangebundener ATPase-Aktivität, vor allem weil die gereinigte ATPase eine andere Kationen-Selektivität besitzt.
- 2) Bei Insekten sind dem Kaliumtransport ähnliche Mechanismen des Ionentransportes bekannt: der Natriumtransport in Malpighi-Gefäßen blutsaugender Dipteren (Gee, 1976) und die Chloridaufnahme im Rectum von Heuschrecken (Phillips, 1983). Für sämtliche Transporte könnte der primäre Schritt ein elektrogener Protonentransport sein. Die Spezifität des Ionentransports sollten sekundär aktive Transportsysteme bestimmen (H^+/K^+ -Antiport, H^+/Na^+ -Antiport, H^+/Cl^- -Symport).
- 3) Diese Vorstellung würde zur allgemein anerkannten Erkenntnis passen, daß in allen Organismen eine große Zahl sekundär aktiver Transportsysteme durch nicht mehr als drei Typen von ATPasen angetrieben werden (Al-Awqati, 1986; Mellman et al., 1986; Nelson, 1988).

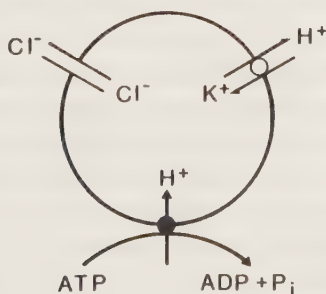


Abb. 15: Modell des aktiven Kaliumtransports über die apikale Gobletzellmembran.

Der Beweis dieser Hypothese kann über die in Liposomen rekonstituierte, gereinigte GCAM-ATPase geführt werden. Sie sollte einen ATP-abhängigen Protonen-Gradienten erzeugen, der auch in Anwesenheit von Kaliumionen bestehen bleibt.

4.2 Solubilisierung der GCAM-ATPase

Die GCAM-ATPase-Aktivität konnte mit dem milden, nicht-ionischen Detergens $C_{12}E_{10}$ solubilisiert werden. Die Bestimmung der verschiedenen ATPase-Aktivitäten in Überstand und Pellet zusammengefaßt, erlaubt die folgenden, die Güte der Solubilisierung charakterisierenden, Aussagen:

- 1) Die Solubilisierung der GCAM-ATPase-Aktivität ist vollständig, da nach der Solubilisierung 90% der Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase im Überstand nachzuweisen sind, und nur 10% im Pellet zurückbleiben. Als Kriterium für Vollständigkeit wird nicht der prozentuale Anteil der Gesamtaktivität im Überstand verglichen mit dem Ausgangsmaterial gewählt, da die im Überstand wiedergefundene Gesamtaktivität die des Ausgangsmaterials um den Faktor 3-4 übertrifft (vgl. Tab. 8), also aktiviert ist. Es werden die Azid- und Vanadat-insensitiven Gesamtaktivitäten in Überstand und Pellet addiert, und der jeweilige Anteil an der Gesamtsumme als Maß der Solubilisierung genommen.
- 2) Die Solubilisierung ist selektiv, da mehr als 90% der ATPase-Aktivität im Überstand Azid- und Vanadat-insensitiv sind. Die mitochondriale ATPase-Aktivität, die das Ausgangsmaterial kontaminiert, bleibt nach dem Solubilisieren zum größten Teil in der unlöslichen Membranfraktion des Pellets.

Mit diesen beiden wesentlichen Resultaten der Experimente zur Solubilisierung der GCAM-ATPase erwies sich die Entscheidung für die mit GCAM angereicherte Membranfraktion als Ausgangsmaterial der Solubilisierung als richtig. Da die

GCAM-ATPase-Aktivität vollständig und selektiv solubilisiert wird, ist die Solubilisierung als erster Reinigungsschritt zu betrachten. Diese Aussage gilt allerdings nur für die ATPase-Aktivitäten, nicht jedoch für den Proteingehalt, da immerhin 70% des Gesamtproteins aus der Membranfraktion gelöst werden.

Oligomere

Die GCAM-ATPase wurde mittels Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten in Form zweier funktioneller oligomerer Zustände isoliert. Hinweise auf die Existenz der Oligomere ergaben sich aus dem Nachweis der ATPase-Aktivität und der Glykoproteinfärbung der beiden hochmolekularen Proteinbanden (ca. 600 und 900 K) in nativen Mikrogelen (Abb. 7). Gestützt wurden diese ersten Hinweise nach der Elution der beiden Proteinbanden aus nativen Polyacrylamid-Gradientengelen und anschließender Analyse durch SDS-PAGE. Nach SDS-PAGE erkennt man für beide Proteinbanden nahezu identische Polypeptidzusammensetzung (Abb. 11).

Die Bildung der Oligomere ist wohl auf das bei der Solubilisierung der ATPase eingesetzte quantitative Verhältnis von Detergens/Proteinmenge zurückzuführen. Dieses kann zur Entstehung unterschiedlicher, jedoch relativ stabiler Aggregate aus ATPase-Molekülen, vielleicht unter Einschluß von Detergens- und/oder Lipidmolekülen aus der Plasmamembran, führen. Die beiden hochmolekularen Proteinbanden erscheinen bereits nach nativer PAGE des rohen Überstands, dieses Muster bleibt nach sämtlichen Prozeduren der Reinigung bestehen. Die Möglichkeit, daß die Ausbildung von Oligomeren ihren Grund im nativen Gelsystem selbst hat, ist unwahrscheinlich. Die nativen Polyacrylamidgele (Mikro- und Flachgele) enthalten als Detergens β -Octylglycosid (vgl. "Material und Methoden") anstelle des in den Experimenten zur Solubilisierung und Reinigung verwendeten $C_{12}E_{10}$, weil aus der Literatur bekannt war (Esmann, 1984), daß während der Polymerisation des Acrylamids durch die dabei entstehenden freien Radikale Oxy-

ethylengruppen des dort eingesetzten $C_{12}E_8$ gespalten werden, und das Detergens dadurch seine amphiphilen Eigenschaften verliert. Dasselbe könnte natürlich auch mit β -Octylglycosid geschehen. In beiden Fällen - intaktes oder zerstörtes β -Octylglycosid - gelangt das mit $C_{12}E_{10}$ solubilisierete Enzym in eine Umgebung, die entweder seine Detergensumgebung qualitativ (im Falle eines intakten β -Octylglycosids) oder quantitativ verändert (falls β -Octylglycosid zerstört wird und dadurch das Verhältnis Detergens/Protein im Gel reduziert wird), und so die Assoziation von löslichen ATPase-Molekülen über hydrophobe Regionen fördert. Der Befund, daß die GCAM-ATPase nach Zentrifugation im Dichtegradienten in der 30%-Saccharosefraktion erscheint, also relativ schwer sein muß, widerspricht jedoch der Vermutung, daß die Oligomeren-Bildung erst im nativen Gelsystem erfolgt.

Die Ausbildung von Oligomeren während der Solubilisierung und Reinigung membranintegraler ATPasen ist nichts Neues. Esmann (1984) beschreibt sie für die (Na^+K^+) -ATPase, die unter bestimmten Bedingungen als Dimer (MG 265 K) solubilisiert wird, ohne Verlust der enzymatischen Aktivität in Monomere dissoziiert, die zeitabhängig wieder zu funktionellen Dimeren aggregieren. Derselbe Autor faßt Befunde mehrerer Arbeitsgruppen zusammen, vergleicht sie mit eigenen Resultaten und kann zeigen, wie aufgrund der Verwendung verschiedener Detergentien nicht nur die mit konventionellen Methoden ermittelten Molekulargewichte differieren, sondern auch die spezifischen Aktivitäten sehr unterschiedlich ausfallen (Esmann, 1983). Die H^+/K^+ -ATPase aus der Plasmamembran der Magenschleimhaut wurde mit β -Octylglycosid als 390 K-Protein solubilisiert (Soumarmon et al., 1983), von dem nach differenzierter Detergensbehandlung angenommen werden darf, daß es als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer vorliegt (Soumarmon et al., 1986). Vergleichbares ist für die gereinigte ATPase aus Plasmamembranen von Schizosaccharomyces pombe, die als Oktamer oder Dekamer isoliert wurde (Dufour & Goffeau, 1978), für die H^+ -ATPase aus der Plasmamembran von

Neurospora (Chadwick et al., 1987), sowie für die Ca^{+} -ATPase des sarcoplasmatischen Reticulums bekannt (Le Maire et al., 1978; Moller et al., 1980).

4.3 Die gereinigte GCAM-ATPase

Die trotz der Inaktivierung während der Reinigungsprozedur erhaltene spezifische Aktivität der GCAM-ATPase ist ein Hinweis darauf, daß sie sämtliche Komponenten, die für die katalytische Aktivität notwendig sind, enthält, und in einer nativen Konformation vorliegt. Da mit der Solubilisierung und Reinigung offensichtlich Aktivierung und Inaktivierung der GCAM-ATPase einhergehen, ist die Bestimmung eines definitiven Reinigungsfaktors wenig sinnvoll, da er leicht über- bzw. unterschätzt werden kann. Der relativ hohe Proteingehalt in der 30%-Saccharosefraktion, läßt einen nur auf den Proteingehalt bezogenen Reinigungsfaktor von 7 als sehr niedrig erscheinen. Er wird jedoch verständlich, zieht man die relativ hohe molekulare Masse der GCAM-ATPase in Betracht. Ein Rechenexempel mag dies verdeutlichen: Nimmt man 30 Proteine mit durchschnittlicher M_r von 60 K an, so würde ein Protein mit M_r 600 K bereits einen Anteil von 25% des Gesamtproteingehalts ergeben. Desweiteren ist es wahrscheinlich, daß die GCAM-ATPase wegen ihrer Molekülgröße mit den elektronendichten Partikeln, den Portasomen, die zahlreich die cytoplasmatische Seite der Apikalmembran der Gobletzellen besetzen, identisch ist, wie es Harvey et al. (1981) annehmen. Damit sollte die GCAM-ATPase, der F_0F_1 -ATPase der inneren Mitochondrienmembran vergleichbar, das in der Apikalmembran überwiegend vorkommende Protein sein. So betrachtet, wäre die Reinigung recht effektiv.

Die gereinigte ATPase bewahrt die prominenten Eigenschaften des membrangebunden Enzyms. Sie zeigt dieselbe KCl-Abhängigkeit und dieselbe Substrat-Spezifität. Ihre Aktivität ist wie die der membrangebundenen GCAM-ATPase-Aktivität nicht mit

Azid zu hemmen und sie ist insensitiv gegenüber 0.1 mM Vanadat. DCCD in geringer Konzentration ist im Unterschied zur membrangebundenen ATPase ein Hemmstoff. Diese erhöhte Sensitivität der gereinigten ATPase kann auf dem jetzigen Stand der Untersuchungen nicht geklärt werden. Membran-gebundene ATPase-Aktivität und Protonentransport (Weerth, 1988) besitzen dieselbe DCCD-Empfindlichkeit; 1.5 μM sind ohne Effekt, 150 μM bzw. 100 μM genügen zur Inhibition. Wurde die GCAM-ATPase als Gesamtkomplex mit einem intakten Protonenkanal solubilisiert (siehe unten), sollte sie dieselbe Sensitivität haben. Ähnlichkeiten mit der mitochondrialen ATPase bestehen wohl kaum. Denn die ist zwar als solubilisierter F_0F_1 -Komplex sensitiv gegen 1 μM DCCD, dann jedoch auch gegenüber Oligomycin (Soper & Pedersen, 1979; Galante et al., 1979).

Die gereinigte GCAM-ATPase ist durch Salze aktivierbar, wenn- gleich mit gegenüber dem membrangebundenen Enzym unterschied- licher Selektivität. Die gereinigte ATPase besitzt eine andere, anscheinend unspezifische Kationen-Selektivität. Die Anionen haben keinen prinzipiell verschiedenen Einfluß auf die membrangebundene und die gereinigte ATPase, nur werden die Effekte klarer. Nitrat ist ein Hemmstoff des membran- gebundenen Enzyms und bleibt einer der gereinigten ATPase. Bicarbonat und Fluorid stimulieren die gereinigte ATPase mehr als die membrangebundene (Tab. 15). Ähnliche Anionen-Effekte werden für die Aktivitäten von Protonenpumpen und H^+ -ATPasen des Vakuolen-Typs berichtet. Besonders die Tonoplasten- ATPasen werden durch Chlorid aktiviert und durch Nitrat gehemmt (Bennet & Spanswick, 1983; Mandala & Taiz, 1985a; Randall & Sze, 1986). Aufgrund der gestiegenen Sensitivität der gereinigten ATPase, werden von Randall und Sze (1986) eine Anionen-Bindungsstelle des Enzyms diskutiert. Moriyama und Nelson (1987a) können für die Anionen-abhängige, gerei- nigte und rekonstituierte ATPase aus chromaffinen Granula auf Anionen-Bindungsstellen sowohl auf der inneren als auch auf der äußeren Membranoberfläche schließen.

Zur Struktur der gereinigten GCAM-ATPase

Die GCAM-ATPase aus der 30%-Saccharosefraktion des Dichtegradienten ist ein komplexes Enzym, das wahrscheinlich aus fünf verschiedenen Untereinheiten mit relativen molekularen Massen von 70, 57, 46, 29 und 17 K besteht. Bisher ist nicht geklärt, ob alle fünf Polypeptide Bestandteile der ATPase sind bzw. welche Komponenten das funktionelle Transportsystem bilden. Aufgrund der kürzlich nachgewiesenen Transportaktivität der membrangebundenen GCAM-ATPase (Weerth, 1988), sollte der in künstliche Lipidvesikel rekonstituierte funktionelle Gesamtkomplex aktiv Protonen transportieren. Hinweise auf die an der katalytischen Reaktion und an der Bildung des Protonenkanals beteiligten Proteine sollten aus künftigen Markierungsexperimenten mit NEM, Nbd-Cl und ATP, sowie DCCD gewonnen werden, wie dies erfolgreich an den H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen in letzter Zeit vorgeführt wurde (vgl. Abschnitt 4.4).

4.4 Die GCAM-ATPase im Vergleich zu anderen Ionentransport-ATPasen

Plasmamembran-ATPasen (P-Typ)

Die Zusammensetzung aus vermutlich fünf verschiedenen Polypeptiden unterscheidet die GCAM-ATPase bereits auf der Ebene der Struktur - und dies ist eines der wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit - von allen anderen bisher bekannten ATPasen aus Plasmamembranen niederer und höherer Eukaryonten, die mit Ausnahme der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 100 K bestehen. Die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase ist aus drei Polypeptiden mit M_r von 96, ca. 50 (Kyte, 1971; Jorgensen, 1974) und 7-8 K zusammengesetzt. Die 96 K-UE bindet Ouabain, die 50 K-UE ist ein Glykoprotein (Kyte, 1972). Das in einigen Präparationen entdeckte kleinere Polypeptid besitzt zwei strukturell ver-

schiedene Regionen, eine mit hydrophilem, eine mit hydrophobem Charakter, die wahrscheinlich die Plasmamembran durchspannt (Collins & Leszyk, 1987). Die H^+/K^+ -ATPase aus der Plasmamembran der Magenschleimhaut wurde als funktionelles 90 K-Protein isoliert (Rabon et al., 1985). Die mit Calmodulin stimulierbare Ca^{2+} -ATPase der Erythrozytenmembran ist ein 130 K- (Villalobo et al., 1986), die Ca^{2+} -ATPase aus der Plasmamembran von Leberzellen ein 110 K-Protein (Pavoine et al., 1987). Die Protonenpumpe aus der Plasmamembran pflanzlicher Zellen hat ein Molekulargewicht von 100 K (Serrano, 1984), die H^+ -ATPase in der Plasmamembran des niederen Eukaryoten Neurospora eines von 105 K (Addison & Scarborough, 1981; Sussman, 1984).

Mitochondriale F_0F_1 -ATPase (F-Typ)

Auf den ersten Blick gleicht die GCAM-ATPase in ihrer Untereinheiten-Struktur den mitochondrialen F_1 -Partikeln. Senior & Brooks (1971) fanden in 10% Polyacrylamidgelen in Anwesenheit von SDS fünf verschiedene Untereinheiten mit M_r von 53, 50, 25, 12.5 und 7.5 K für die aus dem Rinderherzen isolierte F_1F_0 -ATPase und schätzten das Molekulargewicht des Gesamtkomplexes auf 365 K. Lambeth & Lardy (1971) bestimmten ein Molekulargewicht von 355 K nach Gleichgewichtszentrifugation und fanden nach Elektrophorese in 5%-Polyacrylamidgelen (mit SDS) vier Untereinheiten mit 53, 28, 12,5 und 8-9 K. In sehr aufwendigen Untersuchungen mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese, Gelfiltration, Aminosäureanalyse und Gleichgewichtszentrifugation, bestimmten Knowles & Penefsky (1972) fünf Untereinheiten mit Molekulargewichten von 54, 50, 33, 17.5 und 5.7 K, wobei die drei großen Untereinheiten mehr als 90% des Gesamtproteingehalts darstellten, und sich die kleinste Untereinheit als der von Pullman & Monroy (1963) entdeckte natürliche Hemmstoff der mitochondrialen ATPase erwies. Diese schon früh mit konventionellen biochemischen Methoden gewonnenen Ergebnisse wurden von Walker et al.

(1985) durch die Aufklärung der Primärstruktur der isolierten fünf Untereinheiten der F_1 -ATPase bestätigt. Sie fanden ein Molekulargewicht von 371.135 K für den Gesamtkomplex aufgrund stöchiometrischer Verhältnisse von 3:3:1:1:1 der mit $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ bezeichneten Untereinheiten.

Die gereinigte GCAM-ATPase-Aktivität gleicht der mitochondrialen ATPase auch in der Substrat-Spezifität. Unterschiede existieren hinsichtlich der Wirkung von Anionen und Inhibitoren. Die mitochondriale ATPase-Aktivität wird durch HCO_3^- wesentlich stärker stimuliert (Faktor 6-9) als die GCAM-ATPase-Aktivität. Azid, hemmt die mitochondriale ATPase bereits in geringen Konzentrationen, nicht jedoch die GCAM-ATPase (Ebel & Lardy, 1975; Pullman et al., 1960; Pedersen, 1975). DCCD, ursprünglich als Hemmstoff der den Protonenkanal bildenden F_0 -Einheit bekannt, hemmt auch die Aktivität der solubilisierten mitochondrialen F_1 -ATPase indem es an einen Glutamat-Rest der katalytischen F_1 -Einheit bindet (Pougeois et al., 1979; Esch et al., 1981). Die Inhibition erfolgt allerdings nur bei niedrigen pH-Werten und mit hohen DCCD-Konzentrationen, so daß dies keine mit der GCAM-ATPase gemeinsame Eigenschaft ist.

H^+ -ATPasen saurer intrazellulärer Organellen (V-Typ)

Die bereits diskutierte Verwandtschaft der GCAM-ATPase mit den H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen setzt sich auf der Ebene der Struktur fort, wenngleich das native Molekulargewicht nicht endgültig bestimmt ist und auch über dasjenige der Vakuolen-ATPasen bis heute nur wenig und dazu Unterschiedliches bekannt ist. Für die H^+ -ATPase aus Tonoplasten fanden Randall und Sze (1986) 400 - 700 K, Marin et al. (1985) bestimmten 200 K und Mandala und Taiz (1985b) 400 K. Das Molekulargewicht der Protonenpumpe aus "clathrin coated vesicles" wurde von Xie und Stone (1986) mit 530 K angegeben, während Forgac und Berne (1986) eines von 215-247 K ermittelt-

ten. Obwohl nicht in identischer Weise, so bilden die Vakuolen-ATPasen, ähnlich wie die GCAM-ATPase, einen Komplex aus mehreren verschiedenen Polypeptiden. So besteht die Tonoplasten-ATPase aus mindestens drei verschiedenen Untereinheiten von 72 - 74, 60 - 64 und 14 - 18 K (Randall et al., 1984; Mandala & Taiz, 1986). Marin et al. (1985) fanden Polypeptide mit 66, 54, 23 und 13 K. Die 72 K-Untereinheit kann mit Nbd-Cl, das an Cystein-SH- oder Tyrosyl-OH-gruppen bindet, markiert werden (Mandala & Taiz, 1986). Da die Markierung in Anwesenheit von Mg-ATP, dem Substrat der ATPase, reduziert ist (Randall & Sze, 1987), könnte diese Untereinheit die katalytische sein. DCCD bindet an das 16 K-Protein (Randall & Sze, 1987; Mandala & Taiz, 1986), das als Proteolipid wahrscheinlich den Protonenkanal bildet (Kaestner et al., 1988). Antikörper gegen die 72 K-UE, die die ATPase-Aktivität hemmen, reagieren mit der Vakuolen-ATPase von Neurospora (Mandala & Taiz, 1986), die aus 70, 62 und 15 K-Untereinheiten besteht.

Die H^+ -ATPase chromaffiner Granula besteht aus fünf Polypeptiden mit 115, 72, 57, 39 und 17 K (Untereinheiten I-V, Moriyama & Nelson, 1987a). NEM bindet mit hoher Affinität an die Untereinheit II (72 K) und hemmt dadurch die ATPase-Aktivität und den Protonentransport. Da die Hemmung durch NEM in Anwesenheit von ATP und ADP aufgehoben ist, übernimmt dieses NEM- und ADP-bindende Protein wahrscheinlich eine Schlüsselfunktion im Mechanismus der ATPase-Reaktion (Moriyama & Nelson, 1987b). Die Protonenpumpe der 'clathrin-coated vesicles' besteht wahrscheinlich aus 8 Polypeptiden mit M_r 116, 70, 58, 40, 38, 34, 33 und 15 K (Xie & Stone, 1986). DCCD hemmt den Protonentransport, indem es an ein extrem hydrophobes Polypeptid (M_r 17 K) bindet (Arai et al., 1987).

Wie die membrangebundene Form, gleicht auch die gereinigte GCAM-ATPase in ihrer Inhibitor-Sensitivität den solubilierten H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen. Die Tonoplasten-ATPase höherer Pflanzen, sowie die Vakuolen-ATPase in Hefen sind insensitive gegenüber Azid und Vanadat, jedoch

sensitiv gegenüber DCCD und Nitrat (Mandala & Taiz, 1985b; Marin et al., 1985; Uchida et al., 1985). Die rekonstituierten Protonenpumpen aus 'clathrin-coated vesicles' und Lysosomen reagieren insensitiv gegenüber Azid und Vanadat (Xie & Stone, 1986; D'Souza et al., 1987), NEM und Nitrat hemmen die H^+ -ATPase in chromaffinen Granula (Moriyama & Nelson, 1987a).

Als Resultat des durchgeführten Vergleichs der GCAM-ATPase mit anderen Ionentransport-ATPasen bleibt: Die GCAM-ATPase gehört als ein Enzym der Plasmamembran zur Familie der Vakuolen-ATPasen, deren negative Identität in ihrem - soweit bis heute bekannt - großem Molekulargewicht, ihrer Zusammensetzung aus mehreren verschiedenen Polypeptiden, wie auch ihrer Insensitivität gegenüber den Hemmstoffen der klassischen ATPasen Azid, Oligomycin (F-Typ) und Vanadat (P-Typ) besteht. Wie homogen diese neue Gruppe von ATPasen wirklich ist, welche phylogenetischen Verwandtschaften zwischen ihnen selbst und den klassischen ATPasen existieren, und welchen Rang darin die GCAM-ATPase letztlich einnehmen wird, sollte in künftigen Experimenten über Vergleiche von Antikörper-Spezifitäten und Aminosäuresequenzen gewonnen werden. Eine engere Beziehung besteht vermutlich zwischen den ATPasen des F- und V-Typs. Sie bilden kein phosphoryliertes Zwischenprodukt im Reaktionszyklus, ihre Aktivität wird durch DCCD gehemmt und sie bestehen aus mehreren verschiedenen Polypeptiden. Eventuell gibt es sogar eine Verbindung der V-Typ-ATPasen bis hin zu den Archaeobakterien. Eine membran-gebundene ATPase aus Halobacterium halobium ist insensitiv gegen Azid und Vanadat und aus mindestens zwei Untereinheiten mit 86 K und 64 K zusammengesetzt (Nanba & Mukohata, 1987).

4.5 Die GCAM-ATPase - eine Vakuolen-Typ-ATPase in der Plasmamembran

Die GCAM-ATPase ist als eine Vakuolen-Typ-ATPase permanent in der Plasmamembran integriert. Einen Ansatzpunkt, diesen ungewöhnlichen Befund verständlich zu machen, bietet die Entstehungsgeschichte der apikalen Gobletzellmembran: während der Ontogenese führt nämlich erst die Verschmelzung eines geschlossenen intrazellulären Vesikels mit der apikalen Plasmamembran zur Entstehung eines zentral in die Gobletzelle ziehenden extrazellulären Hohlraums (goblet cell cavity). Dieser hält lediglich über eine enge Öffnung die Verbindung mit dem Darmlumen (Hakim et al., 1988). Membranflüsse vergleichbarer Art sind eine wesentliche Erscheinung zellulärer endo- und exozytotischer Vorgänge (Mellman et al., 1986). Dabei stellt die nur temporäre Insertion einer Protonenpumpe des V-Typs in die Plasmamembran renaler Epithelien eine Besonderheit dar. Die H^+ -ATPase befindet sich ursprünglich in den Membranen kleiner intrazellulärer Vesikel (Gluck et al., 1982a, Schwartz & Al-Awqati, 1985). Wenn aufgrund hoher Stoffwechselaktivität der intrazelluläre pH sinkt, erhöht sich die Ca^{2+} -Konzentration. Als Folge davon verschmelzen die Vesikel mit der Plasmamembran, die H^+ -ATPase ist nun dort integriert. Die Anzahl der Protonenpumpen in der Membran wird durch Endo- und Exocytose der Vesikel variiert, der intrazelluläre pH auf diese Weise reguliert (van Adelsberg & Al-Awqati, 1986). Die Protonenpumpe im Harnblasenepithel der Schildkröte wird nicht durch Oligomycin und Vanadat, jedoch durch 200 μ M DCCD gehemmt (Gluck et al., 1982b). Die kürzlich aus einer Mikrosomenpräparation des Sammelrohrs der Rinderniere partiell gereinigte H^+ -ATPase ist sensitiv gegenüber NEM, sie besitzt ein hohes Molekulargewicht (ca. 550 K), und ist wahrscheinlich aus 10 verschiedenen Polypeptiden mit M_r 78, 56, 45, 38, 31, 15, 14 und 12 K zusammengesetzt (Gluck & Al-Awqati, 1984; Gluck & Caldwell, 1988).

Diese beiden Beispiele, das der temporären funktionellen Insertion einer V-Typ-ATPase in die Plasmamembran renaler

Epithelien sowie die Anwesenheit einer ATPase desselben Typs in der apikalen Gobletzellmembran von Manduca, erweitern das bisher strikt formulierte Konzept der Lokalisation der V-Typ-ATPasen in intrazellulären Organellen. Wie griffig der Name "V-Typ-ATPase" nach genauerer Kenntnis der bisher darunter subsumierten, H^+ -transportierenden ATPasen letztlich ist, wird sich zeigen. Wichtig ist hier, wenn die Aufklärung des Mechanismus der Kalium-Pumpe der Insekten durch die Solubilisierung und Reinigung der GCAM-ATPase einen Schritt vorankommt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Insektenepithelien zeichnen sich durch den Besitz einer elektrogenen Alkali-Ionenpumpe (= Kalium-Pumpe) aus. Sie dient in Sinnesepithelien der sensorischen Transduktion, in gastrointestinalen Epithelien der Sekretion von Salzen und Wasser und der Resorption von Aminosäuren. Die ATPase-Aktivität in reinen Apikalmembranen der Gobletzellen (= GCAM) aus dem Mitteldarmepithel der Raupen des Tabakschwärmers Manduca sexta zeigt die Eigenschaften des elektrogenen Kalium-transportes in diesem Epithel. In der vorliegenden Arbeit wurde diese ATPase-Aktivität (= GCAM-ATPase-Aktivität) solubilisiert, gereinigt und charakterisiert.

1. Die Menge an GCAM, das Ausgangsmaterial für die beabsichtigte Solubilisierung und Reinigung, mußte erhöht werden (4 μg Protein/Larve für die reine GCAM sind 0.25% des Proteingehalts des Mitteldarm-Rohextrakts). Mit einer vereinfachten Methode der Membranpräparation wurde eine verglichen mit reinen GCAM um den Faktor 8 verbesserte Ausbeute an Membranmaterial erreicht. Da die Membranfraktion gering mit mitochondrialer ATPase-Aktivität und Phosphatase-Aktivität kontaminiert war, wurde sie als eine mit GCAM engereicherte Membranfraktion bezeichnet. KCl-Aktivierung, Substratspezifität, Salz-Selektivität und Inhibitor-Sensitivität der Azid- und Vanadat-insensitiven ATPase (= GCAM-ATPase) sind identisch mit der ATPase-Aktivität in reinen GCAM.

2. Die membrangebundene GCAM-ATPase-Aktivität konnte mit milden, nicht-ionischen Detergentien solubilisiert werden. Die Solubilisierung mit $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ war vollständig und selektiv hinsichtlich der GCAM-ATPase-Aktivität. Selektiv bedeutet, daß die Azid-sensitive mitochondriale ATPase-Aktivität nach der Solubilisierung zum größten Teil im unlöslichen Membranmaterial bleibt. Organische Lösungsmittel waren für die Solubilisierung der GCAM-ATPase ungeeignet.

3. Die solubilisierete GCAM-ATPase wurde mittels Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten in Form zweier hochmolekularer Proteinkomplexe (600 und 900 K) gereinigt. Sie besteht wahrscheinlich aus fünf Polypeptiden mit relativen molekularen Massen von 70, 57, 46, 29 und 17 K.

4. Die gereinigte GCAM-ATPase besitzt dieselbe Substratspezifität und dieselbe Inhibitor-Sensitivität wie die membrangebundene, jedoch eine andere Salz-Selektivität. Während die membrangebundene ATPase überwiegend durch einwertige Alkaliionen aktiviert wird, stimulieren die Anionen Bicarbonat und Fluorid auch die gereinigte ATPase. ATP und GTP sind bevorzugte Substrate der ATPase. UTP erreicht ca. 35%, CTP ca. 10% der Wirkung der Purinnukleotide. ADP, AMP und NPP werden nicht gespalten. Azid, der typische Hemmstoff der mitochondrialen ATPase (F-Typ-ATPase) sowie Vanadat, der typische Hemmstoff von ATPasen in Plasmamembranen (P-Typ), haben keine Wirkung auf die Aktivität der GCAM-ATPase. N-Ethylmaleimid (NEM) und Nitrat, beides Hemmstoffe der H^+ -translozierenden ATPasen intrazellulärer Organellen (V-Typ), hemmen auch die GCAM-ATPase.

5. Die GCAM-ATPase aus dem Mitteldarmepithel von Manduca sexta ist, obwohl in der Plasmamembran lokalisiert, aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften nicht den bekannten ATPasen aus Plasmamembranen (vom Typ der Na^+K^+ -ATPase), auch nicht der mitochondrialen F_0F_1 -ATPase, sondern überraschenderweise den H^+ -ATPasen intrazellulärer Organellen sehr ähnlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Addison R., Scarborough G.A. (1981) Solubilization and purification of the Neurospora plasma membrane H^+ -ATPase. J. Biol. Chem. 256, 13165-13171
- Adelsberg van J., Al-Awqati Q. (1986) Regulation of cell pH by Ca^{+2} -mediated exocytotic insertion of H^+ -ATPases. J. Cell Biol. 102, 1638-1645
- Al-Awqati (1986) Proton-translocating ATPases. Ann. Rev. Cell Biol. 2, 179-199
- Anderson D.C., King S.C., Parsons S.M. (1981) Uncoupling of acetylcholine uptake from the Torpedo cholinergic synaptic vesicle ATPase. Biochem. Biophys. Res. Com. 103, 422-428
- Apps D.K., Pryde J.G., Sutton R., Philipps J.H. (1980) Inhibition of adenosine triphosphatase, 5-hydroxytryptamine transport and proton-translocation activities of resealed chromaffin-granule `ghosts`. Biochem. J. 190, 273-282
- Arai H., Berne M., Forgac M. (1987) Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17.000-dalton polypeptide by N,N-dicyclohexylcarbodiimid. J. Biol. Chem. 262, 11006-11011
- Bell R.A., Joachim F.G. (1974) Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco hornworms and pink bollworms. Ann. Entomol. Soc. Am. 69, 365-373
- Bennett A.B., Spanswick R.M. (1983) Solubilization and reconstitution of an anion-sensitive H^+ -ATPase from corn roots. J. Membrane Biol. 75, 21-31
- Bowman B.J., Blasco F., Slayman C.W. (1981) Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 256, 12343-12349
- Bowman B.J., Mainzer S.E., Allen K.E., Slayman C.W. (1978) Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatase of Neurospora crassa. Biochim. Biophys. Acta 512, 13-28

- Bowman B.J., Slayman C.W. (1977) Characterization of plasma membrane adenosine triphosphatase of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 252, 3357-3363
- Bowman E.J. (1983) Comparison of the vacuolar membrane ATPase of Neurospora crassa with the mitochondrial and plasma membrane ATPases. J. Biol. Chem. 258, 15238-15244
- Bowman E.J., Mandala S., Taiz L., Bowman B.J. (1986) Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from Neurospora crassa and comparison with the tonoplast membrane ATPase from Zea mays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 48-52
- Bulos B., Racker E. (1968) Partial resolution of the enzyme catalysing oxidative phosphorylation. XVII. Further resolution of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 243, 3891-3900
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
- Cantley L.C., Josephson L., Warner R., Yanagisawa M., Lechene C., Guidotti G. (1977) Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J. Biol. Chem. 252, 7421-7423
- Cantley L.C., Cantley L.G., Josephson L. (1978) A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. J. Biol. Chem. 253, 7361-7368
- Cattel K.J., Lindop C.R., Knight I.G., Beechey R.B. (1971) The identification of the site of action of NN'-dicyclohexylcarbodi-imide as a proteolipid in mitochondrial membranes. Biochem. J. 125, 169-177
- Chadwick C.C., Goormaghtigh E., Scarborough G.A. (1987) A hexameric form of the Neurospora crassa plasma membrane H⁺-ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 252, 348-356
- Cidon S., Nelson N. (1983) A novel ATPase in the chromaffin granule membrane. J. Biol. Chem. 258, 2892-2898

- Cioffi M. (1979) The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (Manduca sexta) in relation to active transport. *Tissue and Cell* 11, 467-479
- Cioffi M., Wolfersberger M.G. (1983) Isolation of separate apical, lateral, and basal plasma membranes from cells of an insect epithelium. A procedure based on tissue organisation and ultrastructure. *Tissue and Cell* 15, 781-803
- Collins J.H., Leszyk J. (1987) The "y subunit" of Na,K-ATPase: a small, amphiphilic protein with a unique amino acid sequence. *Biochemistry* 26, 8665-8668
- Dean G.E., Fishkes H., Nelson P.J., Rudnick G. (1984) The hydrogen ion-pumping adenosine triphosphate of platelet dense granule membrane. *J. Biol. Chem.* 259, 9569-9574
- Deaton L.E. (1984) Tissue K⁺-stimulated ATPase and HCO₃⁻-stimulated ATPase in the tobacco hornworm, Manduca sexta. *Insect Biochem.* 14, 109-114
- Dell'Antone P. (1984) Electrogenicity of the lysosomal proton pump. *FEBS Lett.* 168, 15-22
- Dow J.A.T., Gupta B.L., Hall T.H., Harvey W.R. (1984) X-ray microanalysis of elements in frozen-hydrated sections of an electrogenic K⁺ transport system: The posterior midgut of tobacco hornworm (Manduca sexta) in vivo and in vitro. *J. Membrane Biol.* 77, 223-241
- D'Souza M.P., Ambudkar S.V., August J.T., Maloney P.C. (1987) Reconstitution of the lysosomal proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6980-6984
- Dufour J.P., Boutry M., Goffeau A. (1980) Plasma membrane ATPase of yeast. *J. Biol. Chem.* 255, 5735-5741
- Dufour J.P., Goffeau A. (1978) Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast Schizisaccharomyces pombe. *J. Biol. Chem.* 253, 7026-7032
- Ebel R.E., Lardy H.A. (1975) Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* 250, 191-196

- Esmann M. (1983) Detergent solubilization of Na,K-ATPase. Curr. Top. Membrane Transport 19, 67-82
- Esmann M. (1984) The distribution of C₁₂E₈-solubilized oligomers of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 787, 81-89
- Esmann M., Skou J.Ch. (1984) Kinetic properties of C₁₂E₈-solubilized (Na⁺+K⁺)-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 787, 71-80
- Esmann M., Skou J.Ch., Christiansen C. (1979) Solubilization and molecular weight determination of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase from rectal glands of Squalus. Biochim. Biophys. Acta 567, 410-420
- Esch F.S., Böhlen P., Otsuka A.S., Yoshida M., Allison W.S. (1981) Inactivation of the bovine mitochondrial F₁-ATPase with dicyclohexyl(¹⁴C)carbodiimide leads to the modification of a specific glutamic acid residue in the β subunit. J. Biol. Chem. 256, 9084-9089
- Fillingame R.H (1980) The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 49, 1079-1113
- Flatmark T., Gronberg M., Husebye jr. E., Berge S.V. (1982) Inhibition by N-ethylmaleimide of the MgATP-driven proton pump of the chromaffin granules. FEBS Lett. 149, 71-74
- Forgac M., Berne M. (1986) Structural characterization of the ATP-hydrolyzing portion of the coated vesicle proton pump. Biochemistry 25, 4275-4280
- Forgac M., Cantley I., Wiedenmann B., Altstiel L., Branton D. (1983) Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1300-1303
- Galante Y.M., Wong S.-Y., Hatefi Y. (1979) Composition of complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. J. Biol. Chem. 254, 12372-12378
- Gallagher S.R., Leonard R.T, (1982) Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated and soluble phosphatase activities of corn roots. Plant Physiol. 70, 1335-1340

- Galloway C.J., Dean G.E., Marsh M., Rudnick G., Mellman I. (1983) Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3334-3338
- Gee J.D. (1976) Active transport of sodium by the Malpighian tubules of the Tsetse fly *Glossina morsitans*. *J. Exp. Biol.* 64, 357-368
- Glickman J., Croen K., Kelly S., Al-Awqati Q. (1983) Golgi membranes contain an electrogenic H^+ pump in parallel to chloride conductance. *J. Cell Biol.* 97, 1303-1308
- Gluck S., Al-Awqati Q. (1984) An electrogenic proton-translocating adenosine triphosphatase from bovine kidney medulla. *J. Clin. Invest.* 73, 1704-1710
- Gluck S., Caldwell J. (1988) Proton-translocating ATPase from bovine kidney medulla: partial purification and reconstitution. *Am. J. Physiol.* 254, F71-F79
- Gluck S., Cannon C., Al-Awqati Q. (1982a) Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H^+ -ATPase into lumen membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4327-4331
- Gluck S., Kelly S., Al-Awqati Q. (1982b) The proton translocating ATPase responsible for urinary acidification. *J. Biol. Chem.* 257, 9230-9233
- Gupta B.L., Berridge M.J., Hall T.A., Moreton R.B. (1978) Electron microprobe and ion-selective microelectrode studies of fluid secretion in the salivary glands of *Calliphora*. *J. Exp. Biol.* 72, 261-284
- Hakim R.S., Baldwin K.M., Bayer P.E. (1988) Cell differentiation in the embryonic midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Tissue and Cell* 20, 51-62
- Hanozet G.M., Giordana B., Parenti P., Gueritore A. (1984) L- and D-alanine transport in brush border membrane vesicles from lepidopteran midgut: evidence for two transport systems. *J. Membrane Biol.* 81, 233-240
- Harikumar P., Reeves J. (1983) The lysosomal proton pump is electrogenic. *J. Biol. Chem.* 258, 10403-10410

- Harvey W.R., Cioffi M., Wolfersberger M.G. (1981) Portasomes as coupling factors in active ion transport and oxidative phosphorylation. *Am. Zool.* 21, 775-791
- Harvey W.R., Nedergaard S. (1964) Sodium-independent active transport of potassium in the isolated midgut of the cecropia silkworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 757-761
- Harvey W.R., Haskell J.A., Nedergaard S. (1968) Active transport by the Cecropia midgut. *J. Exp. Biol.* 48, 1-12
- Harvey W.R., Haskell J.A., Zerahn K. (1967) Active transport of potassium and oxygen consumption in the isolated midgut of Hyalophora cecropia. *J. Exp. Biol.* 46, 235-248
- Harvey W.R., Zerahn K. (1971) Active transport of sodium by the isolated midgut of Hyalophora cecropia. *J. Exp. Biol.* 54, 269-274
- Helenius A., Simons K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79
- Johnson R.G., Beers M.F., Scarpa A. (1982) H^+ ATPase of chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 257, 10701-10707
- Jorgensen P.L. (1974) Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 36-52
- Kaestner K.H., Randall S.K., Sze H. (1988) N,N' -dicyclohexyl-carbodiimide-binding proteolipid of the vacuolar H^+ -ATPase from oat roots. *J. Bio. Chem.* 263, 1282-1287
- Kagawa Y., Racker E. (1966) Partial resolution of the enzyme catalysing oxidative phosphorylation. VIII. Properties of a factor conferring oligomycin sensitivity on mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 241, 2461-2466
- Klein U. (1987) Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth Antheraea polyphemus (Saturniidae). *Insect Biochem.* 17, 1193-1204
- Knowles A.F., Penefsky H.S. (1972) The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 6624-6630

- Kyte J. (1971) Purification of the sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. Biol. Chem.* 246, 4157-4165
- Kyte J. (1972) Properties of two polypeptides of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 7642-7649
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lambeth D.O., Lardy H.A. (1971) Purification and properties of rat-liver-mitochondrial adenosine triphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 22, 355-363
- Le Maire M., Lind K.E., Jorgensen K.E., Roigaard H., Moller J.V. (1978) Enzymatically active Ca^{2+} ATPase from sarcoplasmic reticulum membranes, solubilized by nonionic detergents. *J. Biol. Chem.* 253, 7051-7060
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Macara I.G. (1980) Vanadium - an element in search of a role. *Trends Biochem. Sci.* 5, 92-94
- Maddrell S.H.P. (1977) Insect Malpighian tubules. In "Transport of Ions and Water in Animals", (eds. B.L. Gupta, R.B. Moreton, J.L., J.L. Oschman & B.J. Wall), pp. 541-569. New York: Academic Press
- Mandala S., Taiz L. (1985a) Proton transport in isolated vacuoles from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 78, 104-109
- Mandala S., Taiz L. (1985b) Partial purification of a tonoplast ATPase from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* 78, 327-333
- Mandala S., Taiz L. (1986) Characterization of the subunit structure of the maize tonoplast ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 12850-12855
- Mandel L.J., Riddle T.G., Storey J.M. (1980) Role of ATP in respiratory control and active transport in tobacco hornworm midgut. *Am. J. Physiol.* 238, C10-C14

- Marin B., Preisser J., Komor E. (1985) Solubilization and purification of the ATPase from the tonoplast of Hevea. Eur. J. Biochem. 151, 131-140
- Martins O.B., Meis de L. (1985) Stability and partial reactions of the soluble and membrane-bound sarcoplasmic reticulum ATPase. J. Biol. Chem. 260, 6776-6781
- Mellman I., Fuchs R., Helenius A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathway. Ann. Rev. Biochem. 55, 663-700
- Mitchell P., Moyle J. (1971) Activation and inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by various anions and other agents. J. Bioenerg. 2, 1-11
- Moller J.V., Lind K.E., Andersen J.P. (1980) Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 255, 1912-1920
- Moriyama Y., Nelson N. (1987a) The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. J. Biol. Chem. 262, 9175-9180
- Moriyama Y., Nelson N. (1987b) Nucleotide binding sites and chemical modification of the chromaffin granule proton ATPase. J. Biol. Chem. 262, 14723-14729
- Moriyama Y., Takano T., Ohkuma S. (1984) Proton translocation ATPase in lysosomal membrane ghosts. Evidence that alkaline Mg^{2+} -ATPase acts as a proton pump. J. Biochem. 95, 995-1007
- Moyle J., Mitchell P. (1975) Active/inactive state transitions of mitochondrial ATPase molecules influenced by Mg^{2+} , anions and aurovertin. FEBS Lett. 56, 55-61
- Nanba T., Mukohata Y. (1987) A membrane-bound ATPase from Halobacterium halobium: Purification and characterization. J. Biochem. 102, 591-598
- Nelson N. (1988) Structure, function, and evolution of proton-ATPases. Plant Physiol. 86, 1-3
- O'Neil S.D., Bennett A.B., Spanswick R.M. (1983) Characterization of a NO_3^- -sensitive H^+ -ATPase from corn roots. Plant Physiol. 72, 837-846

- O'Neil S.D., Spanswick R.M. (1984) Solubilization and reconstitution of a vanadate-sensitive H^+ -ATPase from the plasma membrane of Beta vulgaris. J. Membrane Biol. 231-243
- Outlaw W.H., Lowry J., Lowry O.H. (1979) Measurement of 10^{-7} to 10^{-12} Mol of potassium by stimulation of pyruvate kinase. Anal. Biochem. 92, 370-374
- Pansini A., Guerrieri F., Papa S. (1978) Control of proton conduction by the H^+ -ATPase in the inner mitochondrial membrane. Eur. J. Biochem. 92, 545-551
- Pavoine C., Lotersztajn S., Mallat A., Pecker F. (1987) The high affinity $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase in liver plasma membrane is a Ca^{2+} pump. J. Biol. Chem. 266, 5113-5117
- Pedersen P.L. (1975) Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria: separate sites involved in ATP hydrolysis and in the reversible, high affinity binding of ADP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 610-616
- Pedersen P.L., Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. Trends. Biochem. Sci. 12, 146-150
- Penefsky H.S. (1979) Mitochondrial ATPase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 49, 223-280
- Phillips J.E. (1983) Cellular mechanisms and control of excretion in insects: recent advances. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 76, 55-68
- Popov N., Schmitt M., Schulzeck S., Matthies H. (1975) Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebehomogenaten. Acta biol. med. ger. 34, 1441-1446
- Pougeois R., Satre M., Vignais P.V. (1979) Reactivity of mitochondrial F_1 -ATPase to dicyclohexylcarbodiimid. Inactivation and binding studies. Biochemistry 18, 1408-1413
- Pullman M.E., Monroy G.C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 238, 3762-3769

- Pullman M.E., Penefsky H.S., Datta A., Racker E. (1960) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 235, 3322-3329
- Rabon E., Gunther R.D., Soumarmon A., Bassilian S., Lewin M., Sachs G. (1985) Solubilization and reconstitution of the gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 260, 10200-10207
- Ramsay J.A. (1953) Active transport of potassium by the Malpighian tubules of insects. *J. Exp. Biol.* 30, 358-369
- Randall S.K., Wang Y., Sze H. (1984) Solubilization and characterization of an anion-sensitive H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* 75, S1
- Randall S.K., Sze H. (1986) Properties of the partially purified tonoplast H⁺-pumping ATPase. *J. Biol. Chem.* 261, 1364-1371
- Randall S.K., Sze H. (1987) Probing the catalytic subunit of the tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* 262, 7135-7141
- Riordan J.F., Vallee B.L. (1972) Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate. *Meth. Enzymol.* 25, 449-456
- Robinson J.D., Flashner M.S. (1979) The (Na⁺+K⁺)-activated ATPase. Enzymatic and transport properties. *Biochim. Biophys. Acta* 549, 145-176
- Rüchel R., Mesecke S., Wolfrum D.I., Neuhoff V. (1973) Mikroelektrophorese an kontinuierlichen Polyacrylamid-Gradientengelen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 354, 1351-1368
- Ruoho A., Kyte J. (1974) Photoaffinity labelling of the ouabain-binding site on (Na⁺+K⁺) adenosinetriphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2352-2356
- Russel T.J. (1984) dpH, H⁺ diffusion potentials, and Mg²⁺ATPase in neurosecretory vesicles isolated from bovine neurohypophyses. *J. Biol. Chem.* 259, 9496-9507
- Sacchi V.F., Hanozet G.M., Giordana B. (1984) α -aminoisobutyric acid transport in the midgut of two lepidopteran larvae. *J. Exp. Biol.* 108, 329-339

- Sachs G., Chang H.H., Rabon E., Schackman R., Lewin M., Saccomani G. (1976) A nonelectrogenic H^+ pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7690-7698
- Schwartz G.J., Al-Awqati Q. (1985) Carbon dioxide causes exocytosis of vesicles containing H^+ pumps in isolated perfused proximal and collecting tubules. *J. Clin. Invest.* 75, 1638-1944
- Senior A.E., Brooks J.C. (1971) The subunit composition of the mitochondrial oligomycin-insensitive ATPase. *FEBS Lett.* 17, 327-329
- Serreno R. (1984) Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 735-740
- Soper J.W., Pedersen P.L. (1979) Isolation of an oligomycin-sensitive ATPase complex from rat liver mitochondria. *Methods Enzymol.* 55, 328-333
- Soumarmon A., Grelac F., Lewin M.J.M. (1983) Solubilization of active $(H^+ + K^+)$ -ATPase from gastric membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 732, 579-585
- Sourmarmon A., Robert J.C., Lewin M.J.M. (1986) Depolymerization of solubilized gastric $(H^+ + K^+)$ -ATPase by n-octylglycoside or cholate. *Biochim. Biophys. Acta* 860, 109-117
- Steinbrecht R.A. (1986) ATPase particles (portosomes) on mitochondrial cristae and the plasma membrane of an insect as demonstrated by freeze substitution. *Naturwissenschaften* 73, 275-276
- Stekhoven F.S., Waitkus R.F., van Moerkerk H.T.B. (1972) Identification of the dicyclohexylcarbodiimid-binding protein in the oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 11, 1144-1150
- Stone D.K., Xie X.-S., Racker E. (1983) An ATP-driven proton pump in clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 258, 4059-4062
- Storer A.C., Cornish-Bowden A. (1976) Concentration of $MgATP^{2-}$ and other ions in solution. *Biochem. J.* 159, 1-5

- Strotmann H., Bickel-Sandkötter S. (1984) Structure, function, and regulation of chloroplast ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 97-120
- Surowy T.K., Sussman M.R. (1986) Immunological cross-reactivity and inhibitor sensitivities of the plasma membrane H^+ -ATPase from plants and fungi. *Biochem. Biophys. Acta* 848, 24-34
- Sussman M.R. (1984) Purification of the Neurospora crassa plasma membrane H^+ -ATPase by High-Pressure Liquid Chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* 142, 210-214
- Sze H. (1985) H^+ -translocating ATPases: Advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Physiol.* 36, 175-208
- Thurm U. (1974) Mechanisms of electrical membrane responses in sensory receptors, illustrated by mechanoreceptors. In "Biochemistry of Sensory Functions" (ed. by L. Jaenicke), pp. 367-390. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Thurm U., Küppers J. (1980) Epithelial physiology of insect sensilla. In "Insect Biology in the Future", VBW 80', (eds. M. Locke & D.S. Smith), pp. 735-764. London, New York: Academic Press
- Toll L., Howard B.D. (1980) Evidence that an ATPase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 1787-1789
- Uchida E., Ohsumi Y., Anraku Y. (1985) Purification and properties of H^+ -translocating, Mg^{2+} -adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* 260, 1090-1095
- Van Dyke R.W., Steer C.J., Scharschmidt B.F., (1984) Clathrin-coated vesicles from rat liver: Enzymatic profile and characterization of ATP-dependent proton transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3108-3112

- Villalobo A., Brown L., Roufogalis B.D. (1986) Kinetic properties of the purified Ca^{2+} -translocating ATPase from human erythrocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 854, 9-20
- Walker J.E., Fearnley I.M., Gay N.J., Gibson B.W., Northrop F.D., Powell S.J., Runswick M.J., Saraste M., Tybulewicz (1985) Primary structure and subunit stoichiometry of F_1 -ATPase from bovine mitochondria. *J. Mol. Biol.* 184, 677-701
- Walker R.R., Leigh R.A. (1981) Characterization of a salt-stimulated ATPase activity associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 153, 140-149
- Wallmark B., Stewart B., Rabon E., Saccomani G., Sachs G. (1980) The catalytic cycle of gastric (H^+ + K^+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 255, 5213-5319
- Wang Y., Sze H. (1985) Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H^+ -ATPase of oat roots. *J. Biol. Chem.* 260, 10434-10443
- Weerth S. (1988) ATP-abhängiger elektrogener Protonen-transport in K^+ -transportierenden Membranen des Mitteldarmepithels von *Manduca sexta*. Diplomarbeit, Universität München.
- Wieczorek H. (1982) A biochemical approach to the electrogenic potassium pump of insect sensilla: potassium sensitive ATPases in the labellum of the fly. *J. Comp. Physiol.* 148, 303-311
- Wieczorek H., Gnatzy W. (1985) The electrogenic potassium pump of insect cuticular sensilla. Further characterization of ouabain- and azide-insensitive, K^+ -stimulated ATPases in the labellum of the blowfly. *Insect Biochem.* 15, 225-232
- Wieczorek H., Wolfersberger M.G., Cioffi M., Harvey W.R. (1986) Cation-stimulated ATPase activity in purified plasma membranes from tobacco hornworm midgut. *Biochim. Biophys. Acta* 857, 271-281

Wolfersberger M., Cioffi M., Harvey W.R. (1982)

Transepithelial potassium transport in insect midgut by electrogenic alkali metal ion pump. *Curr. Top. Membrane Transp.* 16, 109-133

Xie X.-S., Stone D.K. (1986) Isolation and reconstitution of the clathrin coated proton translocating complex.

J. Biol. Chem. 261, 2492-2495

Zacharius R.M., Zell T.E., Morrison J.H., Woodlock J.J.

(1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamid gels. *Anal. Biochem.* 30, 148-152

LEBENS LAUF

Name:	Helmut Schweikl
Geburtsdatum:	08.11.1955
Geburtsort:	Regen/Bayern
Eltern:	Erwin Schweikl, Optiker Maria Schweikl, geb. Kufner, Schneiderin
1962-1966	Volksschule Schweinhütt/Regen
1966-1975	Gymnasium Zwiesel/Bayern, mat.nat.wiss. Zweig
6/1975	Abitur
1976/1977	Studium der Germanistik, Geschichte und Sozialkunde an der Universität München
WS 1977	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
SS 1979	Diplom-Vorprüfung
SS 1982	Diplom-Hauptprüfung
9/1982-8/1983	Diplomarbeit unter Anleitung von PD Dr. H. Wieczorek am Institut für Zoologie der Universität Regensburg
9/1983-8/1984	Wiss. Hilfskraft bei Prof. Dr. D. Burkhardt, Lehrstuhl für Zoologie, Universität Regensburg
9/1984-4/1986	Doktorarbeit unter Anleitung von PD. Dr. H. Wieczorek am Institut für Zoologie der Universität Regensburg
5/1986-3/1988	Fortsetzung der Doktorarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. H. Wieczorek
4/1988	Wiss. Angestellter an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität Regensburg



